

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Sven Ljubić

**Ekspresija semaforina-4D, -6D,  
-3C i -7A u infekciji virusom  
hepatitisa C**

Diplomski rad

Zagreb, 2017

Ovaj rad je izrađen u Klinici za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Snježane Židovec-Lepej. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Prije svega, veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Snježani Židovec-Lepej na savjetima, razumijevanju, pomoći, ali i velikoj podršci tijekom pisanja ovog rada.*

*Zahvaljujem se i dr. sc. Lani Gorenec, s kojom sam radio eksperimentalni dio istraživanja, na pružanoj pomoći u bilo kojem trenutku za vrijeme trajanja projekta.*

*Također zahvaljujem kompletnom nastavnom i tehničkom osoblju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu na dragocjenom znanju i stečenom iskustvu.*

*Konačno, veliko hvala i mojoj obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i stimulaciji tijekom studija.*

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Ekspresija semaforina-4D, -6D, -3C i -7A u infekciji virusom hepatitisa C**

Sven Ljubić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Virus hepatitisa C (HCV) je RNA virus iz porodice *Flaviviridae*, rod *Hepacivirus*, koji uzrokuje akutne i kronične bolesti jetre uključujući kronični hepatitis, cirozu te hepatocelularni karcinom. Semaforini predstavljaju vrlo heterogenu skupinu sekretornih i transmembranskih proteina koji sudjeluju u velikom broju fiziološki značajnih procesa uključujući razvoj živčanog sustava, angiogenezu, regulaciju imunološkog odgovora, razvoj raka i dr. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti koncentraciju semaforina-4D, -6D, -3C i -7A u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C metodom enzimskog imunotesta i usporediti s koncentracijama u serumu osoba s kroničnom infekcijom HBV-om i zdravim kontrolama, te analizirati moguću povezanost između koncentracija pojedinih semaforina i kinetike virusne replikacije, stupnja fibroze te genotipa HCV-a. Za kvantifikaciju RNA HCV u serumu primijenjen je kvantitativni test lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, za određivanje genotipa HCV-a korištena je metoda PCR-a i hibridizacije dok su koncentracije semaforina u serumu određene primjenom imunoenzimskog testa. Ustanovljena je statistički značajna razlika u koncentraciji semaforina-7A između inficiranih i kontrolnih uzoraka, korelacija ekspresije SEMA-4D i SEMA-6D sa stopom viremije te povezanost procesa fibroze i kinetike virusne replikacije. Nije zabilježena značajna razlika u ekspresiji semaforina-3C te vrijednostima kliničkih parametara ovisno o genotipu HCV-a. Rezultati ovog rada ukazuju na važnost semaforina u imunopatogenezi kroničnih virusnih hepatitisa.

(55 stranica, 17 slika, 11 tablica, 98 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: imunopatogeneza, fibroza, viremija, epidemiologija

Voditelj: dr. sc. Snježana Židovec-Lepej, docent

Ocjenitelji: dr. sc. Snježana Židovec-Lepej, docent

dr. sc. Petra Korać, docent

dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Rad prihvaćen: 14.09.2017.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **Expression of semaphorin-4D, -6D, -3C and -7A in hepatitis C virus infection**

Sven Ljubić  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Hepatitis C virus (HCV) is an RNA virus of the family *Flaviviridae* (genus *Hepacivirus*) which causes acute and chronic liver diseases including chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Semaphorins represent a very divergent group of secretory and transmembrane proteins that take part in many important physiological processes such as neural development, angiogenesis, immune response regulation, cancer development etc. The aim of this study was to determine semaphorin-4D, -6D, -3C and -7A concentrations in sera of chronic hepatitis C patients and compare them with chronic hepatitis B patients and healthy controls. Possible correlations between semaphorin concentrations and viral replication kinetics, level of fibrosis or HCV genotype were also analysed. HCV RNA in the serum was quantified using quantitative real-time PCR assay, HCV genotyping was performed by PCR and nucleic acid hybridization whereas semaphorin concentrations in the serum were determined by enzyme immunoassay. Concentrations of semaphorin-7A were significantly increased in patients with chronic hepatitis B and C compared to controls. Concentrations of semaphorin-4D and semaphorin-6D correlated significantly with HCV RNA viremia. Additionally, significant correlation between viremia and fibrosis levels was observed in patients with chronic hepatitis C. No significant differences in semaphorin-3C expression or clinical parameter values in regard to HCV genotype were observed. The results of this study suggest an important role of semaphorins in pathogenesis of chronic viral hepatitis.

(55 pages, 17 figures, 11 tables, 98 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Keywords: immunopathogenesis, fibrosis, viremia, epidemiology

Supervisor: Snježana Židovec-Lepej, PhD, Assistant Professor

Reviewers: Snježana Židovec-Lepej, PhD, Assistant Professor

Petra Korać, PhD, Assistant Professor

Željka Vidaković-Cifrek, PhD, Associate Professor

Thesis accepted: 14 September 2017

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	1
1.1. Virus hepatitisa C	1
1.1.1. Genom virusa HCV	2
1.1.2. Struktura i replikacijski ciklus HCV	5
1.1.3. Imunopatogeneza infekcije HCV-om	9
1.1.4. Klasifikacija i epidemiologija HCV infekcije	14
1.2. Semaforini	18
1.2.1. Semaforin-4D	22
1.2.2. Semaforin-6D	23
1.2.3. Semaforin-3C	24
1.2.4. Semaforin-7A	25
1.3. Ciljevi istraživanja	26
<b>2. Materijali i metode</b>	27
2.1. Ispitanici i biološki uzorci	27
2.2. Kvantifikacija RNA HCV	27
2.3. Određivanje genotipa virusa	29
2.3.1. Izolacija RNA HCV	29
2.3.2. Amplifikacija RNA HCV	30
2.3.3. Genotipizacija RNA HCV	31
2.4. Određivanje koncentracije semaforina	32
2.4.1. Određivanje koncentracije semaforina-3C	32
2.4.2. Određivanje koncentracije semaforina-7A	34
2.4.3. Određivanje koncentracije semaforina-4D i -6D	35
2.5. Statistička obrada podataka	36
<b>3. Rezultati</b>	37
3.1. Ispitanici (demografski, virološki i klinički parametri)	37
3.2. Određivanje koncentracije semaforina	38
3.2.1. Kvantifikacija ekspresije semaforina-4D	38
3.2.2. Kvantifikacija ekspresije semaforina-6D	38
3.2.3. Kvantifikacija ekspresije semaforina-3C	38
3.2.4. Kvantifikacija ekspresije semaforina-7A	40
3.3. Analiza korelacije između koncentracije semaforina i odabranih viroloških i kliničkih parametara	41
<b>4. Rasprava</b>	43
<b>5. Zaključci</b>	47
<b>6. Literatura</b>	48
<b>7. Životopis</b>	56

# 1. Uvod

## 1.1. Virus hepatitisa C

Otkriven 1989. (Choo i sur. 1989), virus hepatitisa C (HCV, engl. *Hepatitis C virus*) je RNA virus iz porodice *Flaviviridae* (rod *Hepacivirus*), te jedan od vodećih svjetskih uzroka morbiditeta i smrti (Cooke i sur. 2013). Novija istraživanja pokazala su značajan porast broja HCV-om zaraženih osoba u zadnjem desetljeću, a procjenjuje se da prevalencija HCV infekcije u svijetu iznosi 2.5% tj. da je ovim virusom zaraženo oko 177 milijuna ljudi (Petruzziello i sur. 2016).

Kronična infekcija HCV-om često je povezana s razvojem fibroze i ciroze jetre, nastankom hepatocelularnog karcinoma i smrću (Lauer i Walker 2001). Infekcija HCV-om je posebno značajna u osoba zaraženih virusom ljudske imunodeficijencije (HIV, engl. *Human immunodeficiency virus*) (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 2010). Procjenjuje se da će, unatoč padu incidencije infekcije HCV-om u razvijenim zemljama, mortalitet indirektno povezan sa HCV infekcijom nastaviti rasti tijekom narednih 20 godina (Razavi i sur. 2013). Strategija Svjetske zdravstvene organizacije o virusnim hepatitisima koja uključuje primjenu antivirusnih lijekova, cijepljenje i različite programe prevencije, donosi procjenu o eliminaciji virusnih hepatitisa u svijetu do 2030. g. (Wedemeyer i sur. 2014; Martin i sur. 2013). Usprkos tome, potrebno je bolje razumijevanje samih mehanizama patogeneze kroničnih virusnih hepatitisa s ciljem razvoja novih strategija za suzbijanje infekcije.

HCV se prenosi krvlju te parenteralno, prvenstveno tijekom intravenskog korištenja droga i lijekova odnosno kontaminiranih transfuzija i injekcija (Shepard i sur. 2005). Glavne ciljne stanice za infekciju HCV-om su hepatociti, monociti i dendritičke stanice. Akutne HCV infekcije najčešće su asimptomatske ili s blagim simptomima te u oko 70-80% zaraženih osoba infekcija prelazi u kroničnu fazu (Santantonio i sur. 2008).

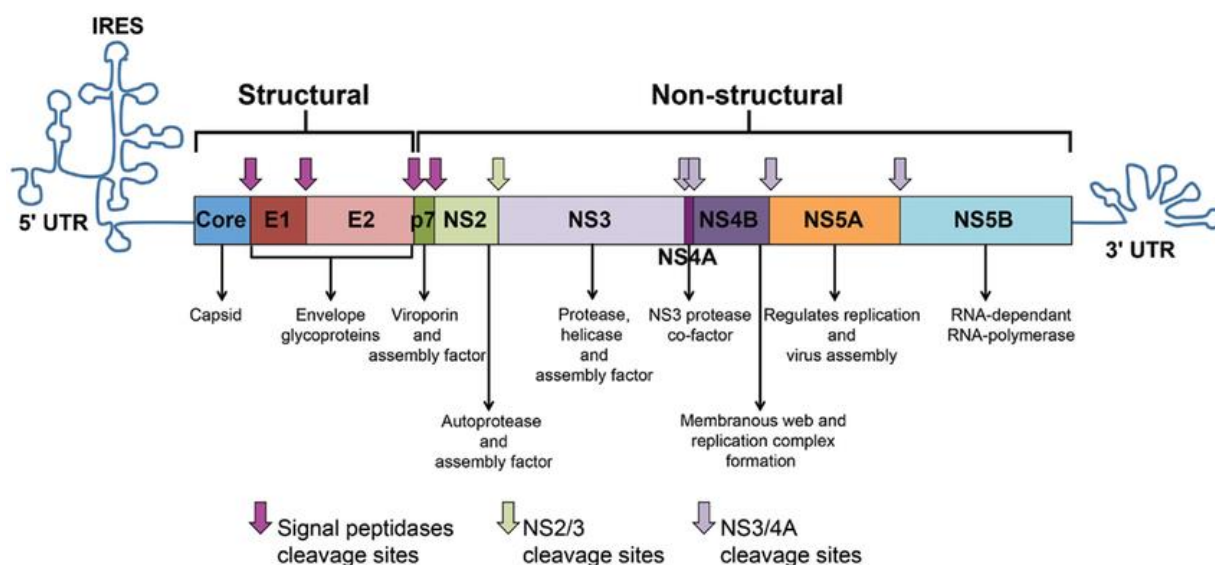
Eradikacija virusa u akutnoj fazi infekcije rezultat je mehanizama specifične stanične imunosti, posebice citotoksičnih CD8<sup>+</sup> T-limfocita specifičnih za HCV i antivirusnih citokina. Tijekom kronične infekcije u većine bolesnika dolazi razvoja fibroze jetre koja prelazi u cirozu u čak 15-25% bolesnika u vremenskom periodu od 10 do 40 godina od infekcije (Lauer i Walker 2001).

Liječenje kroničnog hepatitisa C započelo je prije 20-ak godina primjenom rekombinantnog interferona (IFN- $\alpha$ 2) te kasnije pegiliranog IFN- $\alpha$ 2 uz uspješnost oko 50% u liječenju infekcije genotipom 1 HCV-a (Soriano i sur. 2009; Manns i sur. 2001; Fried i sur. 2002). U liječenju kroničnog hepatitisa C od 2013. g. započela je primjena antiviralnih lijekova koji djeluju direktno (DAA, engl. *direct-acting antivirals*) iz skupina inhibitora proteaze u kombinaciji s pegiliranim IFN- $\alpha$ 2 koja je rezultirala značajno većim postotkom izlječenja bolesnika (oko 80% uspješnosti u osoba zaraženih genotipom 1). Od 2015. g. primjenjuje se liječenje koje se temelji na kombinaciji više DAA iz skupina inhibitora proteaze, polimeraze i proteina NS5A bez uporabe interferona. Uspješnost liječenja kroničnog hepatitisa C s kombinacijom DAA bez interferona veća je od 95% (Pawlotsky 2014). Unatoč brojnim naporima, cjepivo još uvijek nije dostupno.

### 1.1.1. Genom virusa HCV

Genom HCV-a sastoji se od jednolančane RNA molekule koja sadrži 5' i 3' netranslatirajuće regije (UTR, engl. *untranslated region*) koje su važne za replikaciju virusnog genoma, te dva okvira čitanja ORF (engl. *open reading frame*) i ARF (engl. *alternative reading frame*) veličine od 9024 do 9111 parova baza (ovisno o genotipu) (Tellinghuisen i sur. 2007). HCV ORF kodira sintezu poliproteina veličine oko 3000 aminokiselina (ovisno o genotipu virusa) koji se u citoplazmi procesira u strukturne i nestrukturne proteine djelovanjem staničnih i virusnih proteaza (Slika 1).





**Slika 1.** Struktura HCV genoma i proteini (preuzeto od: Abdel-Hakeem i Shoukry 2014)

Konzervirana 5' netranslatirajuća regija sastoji se od 341 nukleotida i smještena je uzvodno od inicijacijskog kodona otvorenog okvira čitanja. Sadrži četiri organizirane domene (I-IV) građene od velikog broja kompleksnih motiva. Domene II, III i IV zajedno čine interno ribosomsko mjesto (IRES, engl. *internal ribosome entry site*) koje direktno veže 40S ribosomsku podjedinicu na kodon AUG i formira stabilni preinicijacijski kompleks bez potrebe za klasičnim faktorima inicijacije translacije čime započinje sinteza HCV poliproteina (Beales i sur. 2001). Regija 3' UTR sadrži oko 225 nukleotida, a građena je od varijabilne regije veličine 30-40 nukleotida, dugog poli(U)-polipirimidinskog lanca, te konzervirane 3' terminalne regije duge 98 nukleotida (3' X regija) vrlo kompleksne strukture. Ova je regija važna za pravilnu replikaciju virusnog genoma (Yi i Lemon 2003).

U glavne strukturne proteine ubrajaju se nukleokapsidni protein (eng. core protein), glikoproteini ovojnice E1 i E2 te p7. Nukleokapsidni protein postoji u tri varijante: p23 tj. nezreli nukleokapsidni protein kojeg signalna peptidaza (SPP, engl. "*Signal Peptide Peptidase*") odvoji od ostatka HCV poliproteina no ostaje usidren na citoplazmatskoj strani membrane endoplazmatskog retikuluma, p21 tj. zreli nukleokapsidni protein koji također nastaje djelovanjem signalne peptidaze domaćina te p17 ili F protein koji je rezultat prepisivanja ARF-a. Nukleokapsidni protein p21 je RNA-vezujući protein čija je primarna uloga u formiranju viralne nukleokapside. Građen je od tri domene: N-terminalne hidrofilne

domene od 120 aa D1, C-terminalne hidrofobne domene od 50 aa D2 i od 20 aa s ulogom signalnog peptida za protein ovojnice E1. Domena D1 veže RNA i sudjeluje u nuklearnoj lokalizaciji dok D2 omogućuje povezivanje nukleokapsidnog proteina s membranama endoplazmatskog retikuluma, vanjskom mitohondrijskom membranom i lipidnim kapljicama. Osim što formira nukleokapsidu, ovaj protein sudjeluje u apoptozi, stimulira rast hepatocita i utječe na ozljeđivanje te nastanak fibroze. Nukleokapsidni protein regulira aktivnost pojedinih gena domaćina poput *c-myc* i *c-fox*, inducira hepatocelularni karcinom kod transgenih miševa, te potiče stvaranje lipidnih kapljica u citoplazmi hepatocita.

Glikoproteini E1 i E2 ključne su komponente ovojnice HCV viriona nužne za fuziju viriona i stanične membrane te ulazak zrele infektivne čestice u stanicu domaćina (Bartosch i sur. 2003) koji se sastavljaju u nekovalentne heterodimere. E2 sadrži hipervarijabilne regije koje često mutiraju i tako omogućuju izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina, a njihove aminokiselinske sekvence razlikuju se do 80% između različitih genotipova HCV-a kao i među podtipovima istog genotipa. E2 ima važnu ulogu u ranoj fazi infekcije putem interakcije s komponentama receptorskog kompleksa (Flint i McKeating 2000). O glikoproteinu E1 dostupno je manje podataka, a smatra se da je uključen u procese membranskih fuzija.

Protein p7 je viroporin koji stvara ionske kanale u lipidnim membranama. Nužan je za virusnu infektivnost i prvenstveno lokaliziran na ER gdje formira ionski kanal koji sudjeluje u regulaciji unutarstanične pH vrijednosti, te tako stimulira replikacijski ciklus virusa (Ali i sur. 2014).

Primarne nestrukturane proteine HCV-a čine NS2, NS3, NS4B, NS5A i NS5B. NS2 je cink-ovisna metaloproteaza koja cijepa HCV poliprotein između NS2 i NS3 što je nužno za virusnu replikaciju i pravilno sastavljanje zrelih infektivnih čestica. Osim proteazne aktivnosti smatra se da također sudjeluje u apoptozi, staničnoj proliferaciji i modulaciji genske ekspresije (Dumoulin i sur. 2003; Erdtmann i sur. 2003).

NS3 je RNA helikaza i serinska proteaza čiju aktivnost modulira NS4A protein. Oba su proteina lokalizirana na ER, te cijepaju HCV poliprotein nizvodno od NS3 što osigurava pravilnu replikaciju virusa. Helikazna domena sudjeluje u vezanju RNA te odmatanju regija sa kompleksnim sekundarnim strukturama posredstvom reakcija hidrolize NTP-a.

Helikaznu aktivnost regulira NS3 proteazna domena u kombinaciji sa NS5B RNA-ovisnom RNA polimerazom (Zhang i sur. 2005).

NS4B je hidrofobni protein od 27 kDa čija funkcija dugo nije bila poznata. Uključen je u modulaciju aktivnosti NS5B RNA-ovisne RNA polimeraze i različite puteve prijenosa signala u stanicama domaćina. Moguće je da sudjeluje u procesu HCV karcinogeneze, narušavanju funkcije ER, te kao ključna platforma u formiranju replikacijskog kompleksa (Egger i sur. 2002).

NS5A je fosforilirani cink-metaloprotein od 58 kDa važan za pravilnu formaciju replikacijskog kompleksa i sastavljanje zrelih infektivnih čestica HCV-a (Huang i sur. 2005) preko interakcija sa lipidnim splanima porijeklom od unutarstaničnih membrana. Hiperfosforilacija narušava navedene interakcije, te negativno utječe na replikaciju viralne RNA (Evans i sur. 2004). NS5A također suprimira imunološki odgovor domaćina tako što inhibira interferonom-aktiviranu proteinsku kinazu PKR (Gale i sur. 1998). S obzirom da stupa u interakciju s proteinima na površini lipidnih kapljica, lipidnim splanima i apolipoproteinima, moguće je da ima i vrlo značajnu ulogu kao posrednik metabolizma lipida.

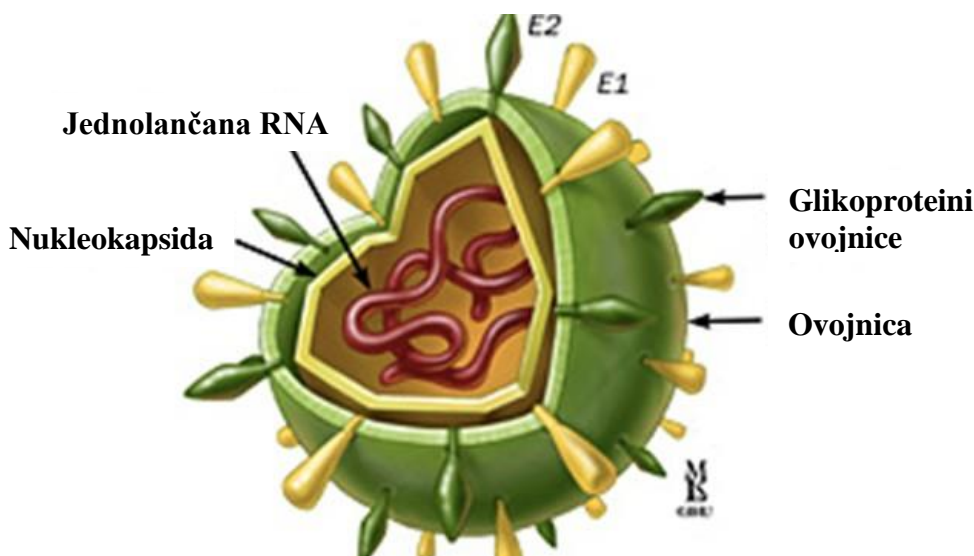
NS5B je RNA-ovisna RNA polimeraza koja sintetizira RNA koristeći genom virusa kao kalup. Poput većine nestrukturnih proteina, lokalizirana je na membrani ER i ima ključnu ulogu u formiranju HCV replikacijskog kompleksa. Iz tog razloga, NS5B protein je i značajna strukturna meta DAA (Pawlotsky i McHutchison 2004). Također veže ciklofilin B, staničnu peptidil-prolil izomerazu koja regulira viralnu replikaciju na način da modulira kapacitet vezanja RNA za NS5B (Watashi i sur. 2005).

### 1.1.2. Struktura i replikacijski ciklus HCV

Virioni HCV-a imaju promjer 50-80 nm i sadrže virusnu RNA oko koje se nalazi nukleokapsida te lipidnu ovojnicu s usidrenim glikoproteinima E1 i E2 (Vieyres i sur. 2014, Slika 2). Obzirom na to da se nukleokapsidni proteini HCV-a povezuju s lipoproteinima, apolipoproteini poput apoE, apoB, apoA1, apoC1, apoC2 i apoC3 često se nalaze povezani

s virionima čiji lipidni sastav nalikuje lipoproteinima niske (LDL) i vrlo niske (VLDL) gustoće pri čemu kolesterolni esteri čine gotovo polovicu ukupnih HCV lipida (Merz i sur. 2011). Apolipoproteini asocirani sa virionom imaju važnu ulogu pri ulasku čestice u stanicu, a smatra se i da pridonose izbjegavanju imunološkog odgovora domaćina tako što prekrivaju površinske HCV glikoproteinske antigene.

Glikoproteini ovojnice HCV ključni su viralni faktori ulaska u stanicu. Vežu se za receptore na površini stanice i potiču fuziju virusne ovojnice i stanične membrane. HCV transmembranski glikoproteini E1 i E2 formiraju nekovalentne heterodimere unutar inficiranih stanica dok na površini viriona egzistiraju u obliku velikih kovalentnih kompleksa stabiliziranih disulfidnim mostovima (Vieyres i sur. 2010). Iako su ranija istraživanja ukazivala na to da E2 komponenta heterodimera katalizira fuzijsku reakciju između ovojnice HCV i stanične membrane domaćina, kristalografske analize su utvrdile kako ta uloga vjerojatno pripada E1 glikoproteinu (Douam i sur. 2014).



**Slika 2.** Struktura HCV viriona (modificirano prema:

<http://player.slideplayer.com/24/7378634/data/images/img4.jpg>)

Tijekom infekcije, virioni najčešće putem krvi dolaze do jetre što omogućuje kontakt viriona s bazolateralnom površinom hepatocita te povezivanje glikoproteina virusne ovojnice s više staničnih površinskih receptora. Prvi kontakt viriona i stanične membrane ostvaruje se preko proteoglikana sindekan-1 ili sindekan-2 odnosno pomoću SRB1 receptora (engl. "scavenger receptor B1") (Dao Thi i sur. 2012), a u procesu sudjeluje i ApoE koji pomaže u vezivanju. Nakon prihvatanja na staničnu površinu potrebno je

koordinirano djelovanje četiri specifičnih faktora ulaska u stanicu: SRB1, tetraspanin CD81, te proteina čvrstih veza claudin-1 (CLDN1) i occludin (OCLN). Osim navedenih glavnih faktora identificirani su i alternativni faktori poput transportera kolesterola nalik Niemann-Pick C1 proteinu (NOC1L1) i transferrinskog receptora 1, čiji mehanizmi djelovanja još nisu razjašnjeni (Martin i sur. 2013). Virion ulazi u stanicu endocitozom u obliku klatrinskih vezikula povezanih s CD81-CLDN1 kompleksom, putuje duž aktinskih stresnih vlakana nakon čega dolazi do fuzije s Rab5a endosomima te otpuštanja genoma u citosol i započinjanja translacije viralnih proteina i replikacije (Coller i sur. 2009).

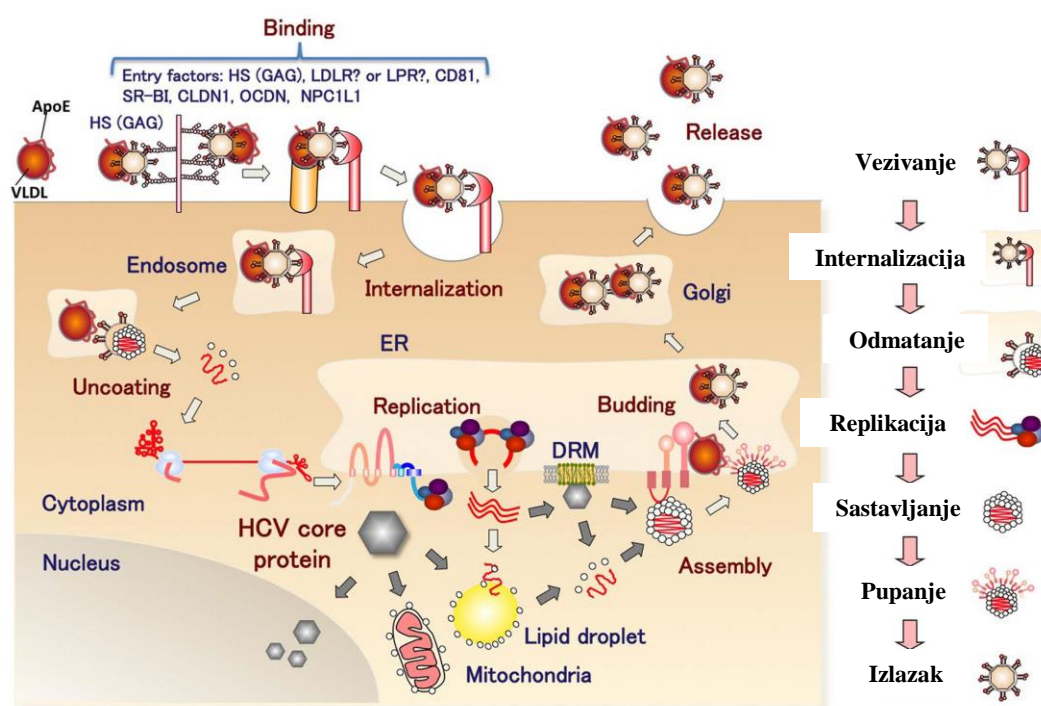
Nakon translacije, proteini HCV-a vežu se na membrane endoplazmatskog retikuluma. Proteini NS3/4A, NS4B, NS5A i NS5B formiraju replikacijski kompleks koji omogućuje umnažanje genomske RNA (Lohmann 2013) pri čemu ključnu ulogu ima enzim NS5B (RNA-ovisna RNA polimeraza). Prilikom replikacije genoma HCV inducira opsežne rearanžmane unutarstaničnih membrana i pritom stvara vrlo specifičan citoplazmatski mikrookoliš, tzv. “membransku mrežu”, koju uglavnom čine vezikule s dvostrukom membranom promjera 150 nm koje se brzo akumuliraju sukladno stopi replikacije RNA (Romero-Brey i sur. 2012; Ferraris i sur. 2010). Zbog sposobnosti oligomerizacije, NS4B predstavlja glavnu platformu za agregaciju vezikula, dok je za indukciju kompletne mrežne strukture potrebno zajedničko djelovanje gotovo svih navedenih nestrukturnih proteina replikacijskog kompleksa.

Osim spomenutih faktora, važnu ulogu ima i fosfatidil-inozitol-4-kinaza-III (PI4KIII) domaćina koja u interakciji s NS5A inducira akumulaciju fosfatidilinozitol-4-fosfata (PI4P) a taj je proces važan za uspostavu ultrastrukturne morfologije membranske mreže (Reiss i sur. 2011).

S obzirom da HCV utječe na ekspresiju gena povezanih sa staničnim metabolizmom lipida, što dovodi do akumulacije unutarstaničnih lipida, smatra se da kolesterol i drugi lipidi imaju određenu ulogu u replikaciji virusa. Lipidne kapljice pronađene u membranskoj mreži su organeli okruženi fosfolipidnim slojem bogatim proteinima koji sadrže velike količine triacilglicerida i kolesterolnih estera, te koordiniraju sintezu viralne RNA i morfogenezu infektivnih čestica (Miyonari i sur. 2007). Stoga lipidi imaju ključnu ulogu u pravilnom sastavljanju i otpuštanju zrelih viriona.

Proces sastavljanja viriona uključuje koordinirano djelovanje E1-E2 glikoproteinskog kompleksa na ER, pakiranje viralne RNA pomoću nukleokapsidnih proteina vezanih uz lipidne kapljice te veći broj viralnih i domaćinskih čimbenika. Virioni HCV-a nastaju pupanjem u endoplazmatski retikulum. Interakcija između nukleokapsidnog proteina i NS5A važan je korak u ovom procesu jer dovodi do zaustavljanja replikacije RNA, a potiče sastavljanje viriona (Miyazawa i sur. 2007; Masaki i sur 2008). Na sličan način NS2 udružuje E1-E2 glikoproteinski kompleks, p7 i NS3-4A kompleks čije su međusobne interakcije nužne za aktivaciju nukleokapsidnog proteina i početak formiranja funkcionalne nukleokapside. Prije izlaska iz stanice virusne čestice prolaze kroz Golgijev aparat što potvrđuju kompleksne modifikacije E1-E2 kompleksa (Vieyres i sur. 2010). Na tom putu važnu ulogu ima p7 protein koji neutralizira kiselu pH vrijednost u pojedinim odjeljcima sekretornog puta (Wozniak i sur. 2010).

Unatoč brojnim istraživanjima, replikacijski ciklus HCV-a (Slika 3) još uvijek nije u potpunosti istražen, posebice mehanizmi iskorištavanja lipidnih komponenata i regulacije lipidnog metabolizma domaćina.



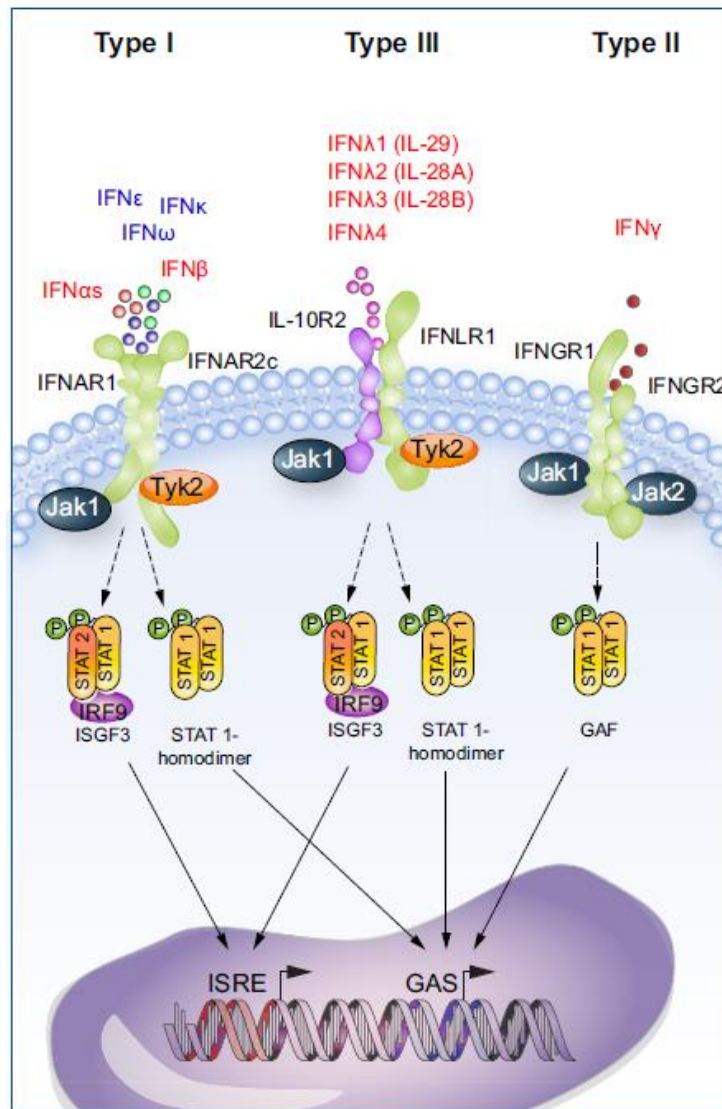
**Slika 3.** Replikacijski ciklus HCV (modificirano prema: Moriishi i Matsuura 2012)

### 1.1.3. Imunopatogeneza infekcije HCV-om

Mehanizmi urođene imunosti predstavljaju prvu liniju obrane od virusnih infekcija. Interferoni (IFN) su središnji citokini odgovorni za indukciju antiviralnog stanja u stanicama te aktivaciju i regulaciju glavnih komponenata urođene imunosti poput NK-stanica (engl. “*natural killer cells*”) (Stetson i Medzitov 2006). Interferoni tipa I (porodica IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ ) i tipa III (IFN- $\lambda$ 1, - $\lambda$ 2 i - $\lambda$ 3; poznati i kao IL29, IL28A i IL28B) sintetiziraju se u stanicama koje su zaražene virusima. Najznačajniji izvori interferona klase I u ljudi su makrofagi i plazmacitoidne dendritičke stanice (DC, engl. “*dendritic cells*”). Interferon tipa II (IFN- $\gamma$ ) sintetiziraju NK-stanice, ali i komponente sustava stečene imunosti, poput antigen-specifičnih T-limfocita (pomoćnički CD4<sup>+</sup> T-limfociti Th1 citokinskog profila i citotoksični T-limfociti).

Glavni signalni putevi prepoznavanja infekcije uključuju put ovisan o Toll-u sličnim receptorima (engl. *Toll-like Receptors, TLR*), te citosolni put aktiviran vezanjem viralne RNA na helikaze gena RIG-1 i antigen Mda5 (Iwasaki i Medzitov 2004; Yoneyama i Fujita 2007). Oba puta aktiviraju ključne transkripcijske faktore NF- $\kappa$ B i IRF3/7 koji prepoznaju promotore interferonskih gena tipa I i III.

Svi interferoni induciraju antiviralno stanje transkripcijom stotina gena ovisno o tipu interferona i vrsti stanice. Broj interferonom-inducibilnih gena značajno se razlikuje te npr. pegilirani IFN- $\alpha$ 2 inducira transkripciju 200-300 gena u hepatocitima dok u mononuklearnim stanicama periferne krvi može aktivirati i više od 2000 gena (Sarasin-Filipowicz 2008). Interferoni tipa I i II iznimno su važan dio urođene imunosti u virusnim infekcijama. “Knock-out” miševi bez funkcionalnih receptora za IFN- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  ili komponentata interferonskog puta prijenosa signala (Slika 4) ugibaju nakon zaraze slabo patogenim virusima dok funkcionalna inaktivacija ovih gena u ljudi uzrokuje imunodeficijencije koje mogu biti letalne i u novorođenačkoj dobi (Dupuis i sur. 2003). IFN-i tipa III imaju posebno značajnu ulogu u obrani epitelnih površina respiratornog i gastrointestinalnog trakta od infekcija (Mordstein i sur. 2010).



**Slika 4.** Transdukcija interferonskog signala putem Jak–STAT (preuzeto od: Heim i Thimme 2014)

#### 1.1.3.1. Akutna faza infekcije

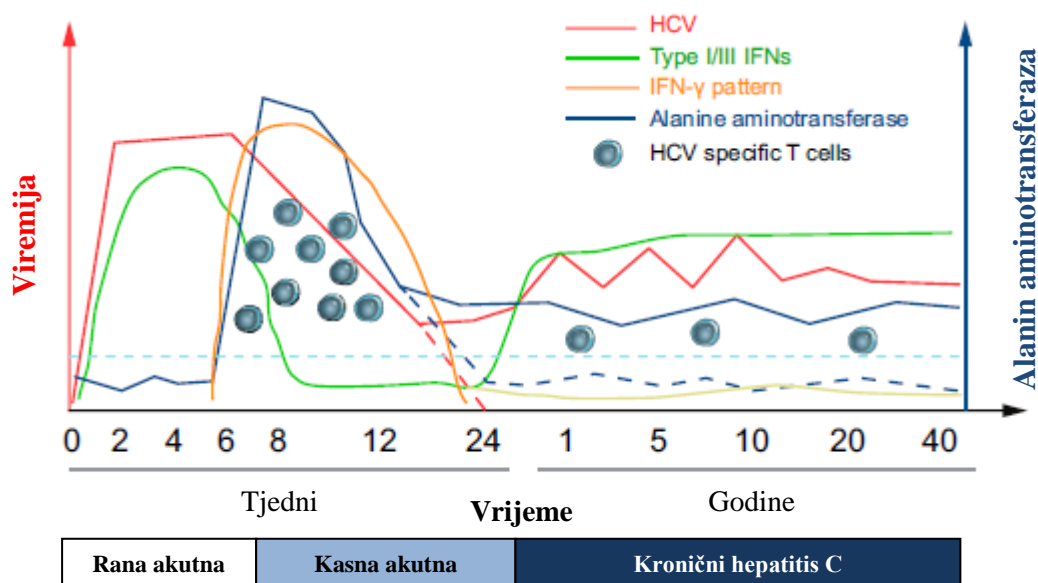
Akutnu fazu HCV infekcije moguće je podijeliti na ranu akutnu fazu prije aktivacije i mobilizacije specifičnih T-limfocita u jetri te na kasnu akutnu fazu u kojoj djeluju mehanizmi sustava stečene imunosti (Slika 5). Samo nekoliko dana nakon infekcije dolazi do urođene imunološke reakcije putem interferonom-inducibilnih gena a opseg aktivacije ovisi o kinetici virusne replikacije i količini virusnih antigena (Su i sur. 2002). Infekcija HCV-om aktivira TLR i RIG-1/Mda5-ovisne signalne puteve. U ranoj fazi imunološkog odgovora važnu ulogu imaju hepatociti te plazmacitoidne dendritičke stanice stimulirane u



direktnom kontaktu s hepatocitima koje su najvažnije stanice u sintezi interferona (Takahashi i sur. 2010). Brza aktivacija transkripcije interferonom-stimuliranih gena vjerojatno je rezultat sinergističkog djelovanja IFN-a tipa I i III.

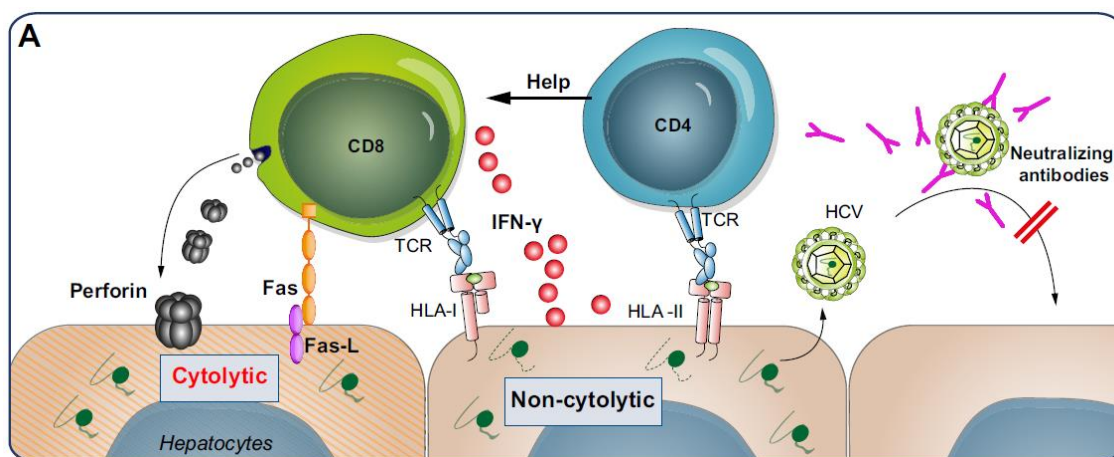
NK-stanice su veliki granulirani limfociti te iznimno značajne stanice urođene imunosti koje su u jetri čovjeka prisutne u znatno većoj količini u odnosu na perifernu krv (Tian i sur. 2013). Ove stanice iskazuju direktni antiviralni i regulatorni učinak putem citolitičkih (apoptoza i kompleksi perforina) i necitolitičkih (IFN- $\gamma$ ) mehanizama, te stoga igraju vrlo važnu ulogu u kontroli viremije u akutnoj fazi infekcije. Djelovanje NK-stanica usko je povezano s opsegom aktivacije T-limfocita pri čemu pojačana degranulacija NK-stanica korelira sa intenzitetom djelovanja mehanizama stečene imunosti (Pelletier i sur. 2010).

Za razliku od urođene imunosti koja se aktivira već nekoliko dana nakon infekcije, potrebno je oko 6-8 tjedana prije no što mehanizmi stečene imunosti (antitijela i T-limfociti) postanu funkcionalni (Klenerman i Thimme 2012). Međutim, većina antitijela specifičnih za strukturne i nestrukturne HCV proteine ne mogu učinkovito spriječiti vezanje viriona za ciljne stanice i ulazak virusa dok je stanična specifična imunost najučinkovitiji dio imunoreakcije na HCV (Logvinoff i sur. 2004).



Slika 5. Prirodni tijek HCV infekcije (modificirano prema: Heim i Thimme 2014)

Eradikacija HCV-a u zaraženom organizmu povezana je sa snažnom i trajnom aktivacijom  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T-limfocita koji su specifični za brojne epitope na različitim proteinima HCV-a, te ih je moguće detektirati tijekom akutne ali i u kroničnoj infekciji (Takaki i sur. 2000).  $CD4^+$  T-limfociti su centralni regulatori stečenog imunološkog odgovora dok su  $CD8^+$  T-limfociti specifični za virus najvažnije efektorske stanice (Slika 6) čiji je antiviralni utjecaj baziran prvenstveno na ekspresiji i djelovanju  $IFN-\gamma$  te manjim dijelom na citoličkim mehanizmima (Dill i sur. 2012).



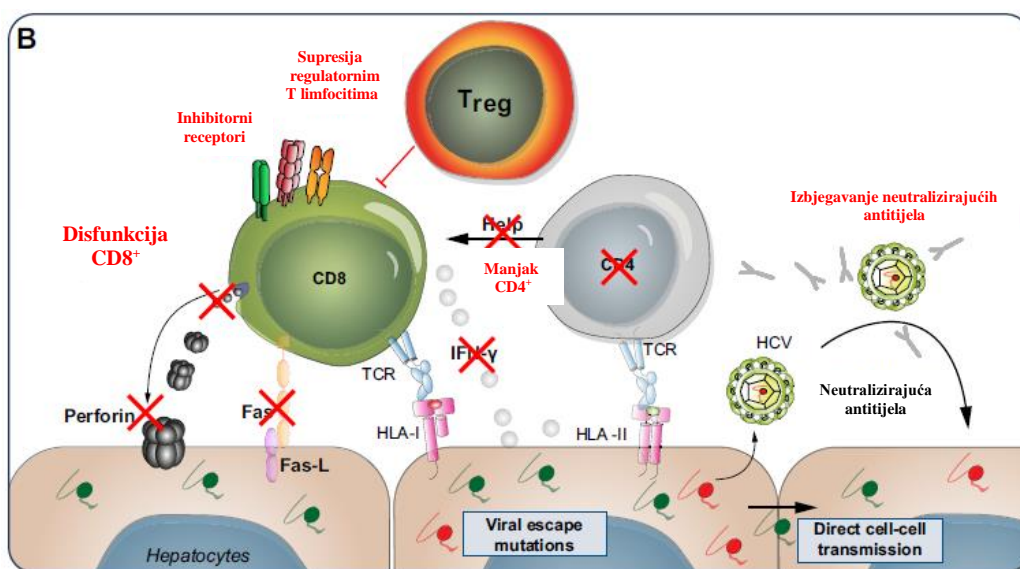
**Slika 6.** Specifična stanična imunost u HCV infekciji (preuzeto od: Heim i Thimme 2014)

### 1.1.3.2. Kronična faza infekcije

U bolesnika s kroničnom HCV infekcijom opseg aktivacije interferonom-stimuliranih gena izrazito je varijabilan tj. u pojedinih osoba dokazana je aktivacija više od stotinu interferonom-inducibilnih gena no postoje i bolesnici kod kojih se aktivacija ovih gena (a time i mehanizama urođene imunosti) ne može dokazati (Wieland i sur. 2014). Usprkos aktivaciji endogenih IFN u stanicama jetre, HCV uspijeva uspostaviti kroničnu infekciju u većine zaraženih osoba. Iako mehanizmi putem kojih HCV interferira s biološkom aktivnosti IFN nisu u potpunosti jasni, većina podataka ukazuje na to da su povezani s interferencijom Jak-STAT signalnog puta te inhibicijom translacije proteina na ribosomima (Chen i sur. 2005). S obzirom da se replikacija HCV-a odvija u substaničnim kompartmentima (uglavnom oko ER-a) postoji mogućnost da je dostupnost antiviralnih interferonom-inducibilnih proteina na mjestima replikacije ograničena ili da virusni proteini interferiraju s antivirusnim proteinima (Dill i sur. 2012).

U kroničnoj HCV infekciji, NK-stanice su aktivirane ali imaju modificirani fenotip i funkciju (npr. pojačano eksprimiraju aktivirajuće receptore poput NKp30 i NKp46, te intenzivno fosforilirane STAT transkripcijske faktore) (Edlich i sur. 2012). Aktivnost NK-stanica u HCV infekciji je suprimirana te ove stanice sintetiziraju snižene koncentracije IFN- $\gamma$ . In vitro, smanjenu sposobnost sinteze IFN- $\gamma$  moguće je rekonstituirati kultivacijom uz stimulaciju citokinima ili ko-kultivacijom s monocitima i dendritičkim stanicama (Zhang i sur. 2013). HCV može neposredno interferirati s djelovanjem NK-stanica. Neki od mehanizama uključuju poticanje monocita na sintezu velikih koncentracija citokina IL-10, direktni kontakt sa inficiranim stanicama, te blokiranje sinteze proteina komplekta (Kim i sur. 2014).

HCV perzistira u organizmu osoba s kroničnom infekcijom usprkos prisutnosti neutralizacijskih antitijela i T-limfocita a pretpostavlja se da postoji više mehanizama koji smanjuju učinkovitost specifične imunosti na HCV (Slika 7). Virus izbjegava mehanizme humoralne imunosti putem mutacija epitopa virusnih površinskih antigena, interakcijom s lipoproteinima visoke gustoće (HDL) ili direktnim međustaničnim transportom (Brimacombe i sur. 2011). Pretpostavlja se da deplecija ili nedovoljna aktivacija HCV-specifičnih CD8<sup>+</sup> T limfocita zbog malog broja ili nedostatno funkcionalnih antigen-prezentirajućih stanica poput makrofaga i dendritičkih stanica također pridonosi ograničenoj učinkovitosti stanične imunosti u HCV infekciji (Rosen 2013).



**Slika 7.** Izbjegavanje sustava stečene imunosti (modificirano prema: Heim i Thimme 2014)

U jetri većine osoba s kroničnom HCV infekcijom mogu se dokazati T-limfociti specifični za HCV. Međutim, snižena sinteza efektorskih citokina u CD4<sup>+</sup> T-limfocitima, ograničena raznolikost T-staničnih receptora (TCR), kao i snižena proliferacijska aktivnost te inhibicija sinteze antiviralnih citokina u CD8<sup>+</sup> T-limfocitima pridonose ograničenoj aktivnosti specifične stanične imunosti u HCV infekciji.

Jedan od važnih mehanizama supresije adekvatne aktivnosti CD8<sup>+</sup> T-limfocita specifičnih za HCV je pojačana koekspresija nekolicine različitih inhibitornih receptora poput PD-1, CTLA-4, TIM-3 i 2B4 (Kroy i sur. 2014; Schlaphoff i sur. 2011). Smanjena aktivnost pomoćničkih CD4<sup>+</sup> T-limfocita i utjecaj regulatornih T-limfocita kao i sinteza IL-10 i sličnih inhibicijskih citokina također doprinose patogenezi kroničnog virusnog hepatitisa. Značajnu ulogu imaju regulatorni CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-limfociti koji mogu usporiti progresiju bolesti jetre u kroničnoj fazi infekcije inhibirajući CD8<sup>+</sup> T limfocite direktnim međustaničnim kontaktom u animalnim modelima (Franceschini i sur. 2009).

Svi navedeni mehanizmi zajednički pridonose disfunkciji T-limfocita specifičnih za HCV, međutim doprinose pojedinačnih procesa u patogenezi kroničnog virusnog hepatitisa tek treba istražiti.

#### 1.1.4. Klasifikacija i epidemiologija HCV infekcije

HCV jedan je od vodećih globalnih uzroka smrti i morbiditeta u čovjeka (Mohd i sur. 2013). Antitijela specifična za virus u serumu zaraženih osoba najčešće se koriste kao biljeg infekcije u epidemiološkim istraživanjima kao i u procjeni rasprostranjenosti infekcije u pojedinim geografskim područjima. Analiza distribucije pojedinih virusnih genotipova i subtipova također se koristi u epidemiološkim istraživanjima te proučavanju puteva širenja infekcije na globalnoj razini.

HCV je klasificiran u 7 poznatih genotipova temeljem sekvence viralnog genoma, pri čemu se pojedini genotipovi razlikuju u 30-35% nukleotidnih mjesta. Genotipovi su klasificirani u 86 podtipova koji se međusobno razlikuju u manje od 15% nukleotidnih sekvenci no postoje i provizorno klasificirani podtipovi koji se za sada moraju još detaljnije

istražiti (HCV classification. International Committee on Taxonomy of Viruses. URL: [https://talk.ictvonline.org/ictv\\_wikis/flaviviridae/w/sg\\_flavi/56/hcv-classification](https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification) (pristupljeno 21.07.2017.)

Geografska distribucija genotipova HCV-a u svijetu vrlo je kompleksna. Takozvani „epidemijski podtipovi“ (1a, 1b, 2a i 3a) široko su rasprostranjeni diljem svijeta i čine veliki udio u ukupnom broju globalnih infekcija, posebno u razvijenijim zemljama gdje su se najvjerojatnije proširili 70-ih i 80-ih godina prošlog stoljeća putem kontaminiranih transfuzija i uporabom droga. S druge strane, tzv. „endemijski sojevi“ znatno su rjeđi i vezani uz specifična područja poput zapadne i srednje Afrike te jugoistočne Azije (npr. do sada je zabilježen samo jedan slučaj HCV infekcije genotipa 7, u jednoj od zemalja srednje Afrike). Opsežnom pretragom literature publicirane u razdoblju od 2000. do 2015. Petruzzello i sur. (2016) prikupili su podatke iz 138 zemalja (obuhvaćaju oko 90% svjetske populacije) o prevalenciji infekcije, broju dijagnosticiranih zaraza te distribuciji genotipova HCV-a.

Ukupna globalna rasprostranjenost HCV-a procjenjuje se na oko 2.5% (177 milijuna zaraženih odraslih osoba). Srednja Azija i srednja Afrika imaju visoku prevalenciju infekcije (>3.5%); jugoistočna Azija, zapadna i istočna Afrika, Bliski Istok, Latinska Amerika i istočna Europa imaju umjerenu prevalenciju (1.5% - 3.5%); dok južna Afrika, Sjeverna Amerika, pacifički obruč te zapadna i srednja Europa (Slika 8) imaju nisku prevalenciju (<1.5%) HCV infekcije.

Analiza je pokazala da su se globalna prevalencija i broj HCV-om zaraženih osoba, u usporedbi sa sličnom studijom u periodu od 1990-2005, smanjili sa 2.8% na 2.5% odnosno sa 185 na 177 milijuna zaraženih osoba. Najveće smanjenje broja zaraženih osoba zabilježeno je u razvijenim zemljama, posebno u zapadnoj Europi (-1.5%), dok je znatno povećanje broja oboljelih zabilježeno u manje razvijenim zemljama srednje Afrike (+3.7%) i srednje Azije (+2.0%).

Procjenom ukupnog broja viremičnih osoba, ustanovljeno je da prosječna globalna stopa viremije iznosi 67% (118.9 milijuna osoba s mjerljivom RNA HCV u serumu) s rasponom od 48.7% u srednjoj Aziji pa do 80.2% u Latinskoj Americi (Tablica 1). Unatoč dobivenim rezultatima treba spomenuti kako neke zemlje (poput Poljske), za koje se godinama smatralo kako bilježe rastuću stopu HCV viremije, imaju znatno manji broj

zaraženih osoba, što je vjerojatno posljedica dugogodišnje upotrebe nekvalitetnih seroloških HCV testova niske specifičnosti bez potvrdnih testova detekcije HCV antigena (Godzik i sur. 2012).

Genotip 1 odgovoran je za 49.1% ukupnog broja infekcija HCV-om u svijetu tj. najčešća je genetska varijanta ovog virusa. Zatim slijede genotip 3 (17.9%), genotip 4 (16.8%), genotip 2 (11.0%), genotip 5 (2.0%) i genotip 6 (1.4%). Nedefinirani ili mješoviti genotipovi čine 1.8% svih HCV infekcija (Tablica 2).

**Tablica 1.** Svjetska rasprostranjenost virusa hepatitisa C i broj zaraženih osoba (svih dobi)

Kontinent	Anti-HCV prevalencija (%)	Stopa viremije (%)	Populacija 2013 (milijuni)	Anti-HCV detekcije (milijuni)	HCV viremija (milijuni)
Afrika	2.9	70.5	927.0	26.9	19.0
Bliski Istok	2.7	68.8	469.0	12.7	8.7
Amerika	1.3	74.0	953.7	12.4	9.2
Azija	2.8	64.4	3985.0	111.6	71.9
Australazija	1.8	74.8	28.0	0.5	0.4
Europa	1.8	72.4	742.5	13.4	9.7
Ukupno	2.5	67.0	7105.2	177.5	118.9

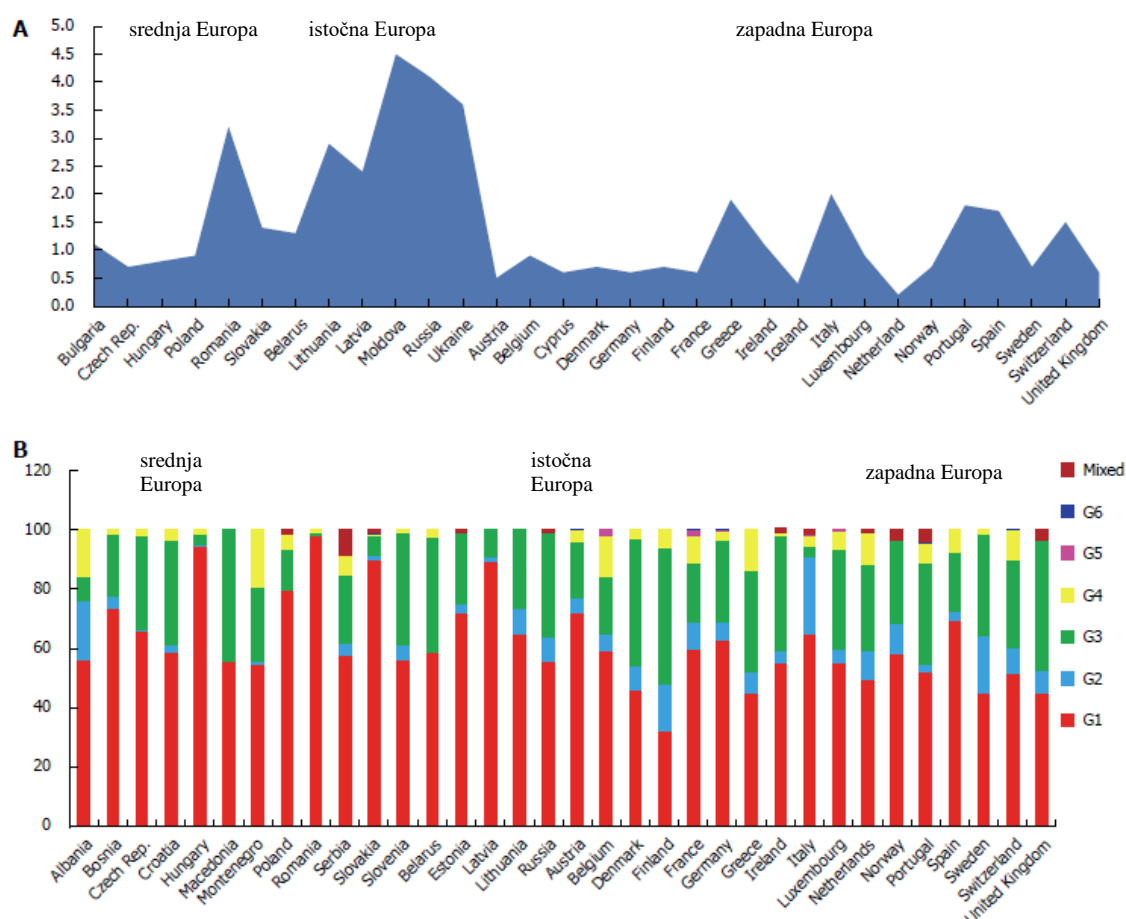
Modificirano prema Petruzzello i sur. (2016)

**Tablica 2.** Rasprostranjenost genotipova HCV-a u svijetu

Kontinent	G1 (%)	G2 (%)	G3 (%)	G4 (%)	G5 (%)	G6 (%)	Mješoviti
Afrika	26.3	23.7	6.3	28.1	12.2	-	3.4
Bliski Istok	27.3	0.8	6.3	65.3	0.3	-	-
Amerika	74.5	10.2	10.6	1.7	0.1	0.3	2.6
Azija	46.6	18.6	22.4	1.0	0.1	7.0	4.3
Australazija	55.0	6.5	36.0	1.2	-	1.3	-
Europa	64.4	5.5	25.5	3.7	0.1	0.1	0.7
Ukupno	49.1	11.0	17.9	16.8	2.0	1.4	1.8

Modificirano prema Petruzzello i sur. (2016) G1; G2; G3; G4; G5; G6 - genotipovi HCV-a

Potrebno je istaknuti da analiza Petruzziello i sur. (2016) ima i određena ograničenja, prvenstveno zbog oskudnih literaturnih podataka iz Afrike i Azije. Osim toga, u većini analiziranih područja broj ispitanika u epidemiološkim istraživanjima bio je ograničen (u samo 21% od 138 ispitivanih zemalja uzorak ispitanika u nacionalnim istraživanjima bio je veći od 10,000). Usprkos tome, može se zaključiti da je u razdoblju od 2005. do danas zabilježeno smanjenje globalne rasprostranjenosti HCV-a u svijetu. Nova saznanja o distribuciji genotipova HCV-a na nacionalnoj razini biti će ključna za bolje razumijevanje puteva širenja infekcije ali i potrebe razvoja cjepiva u zemljama gdje je raznolikost virusa na molekularnoj razini vrlo velika.

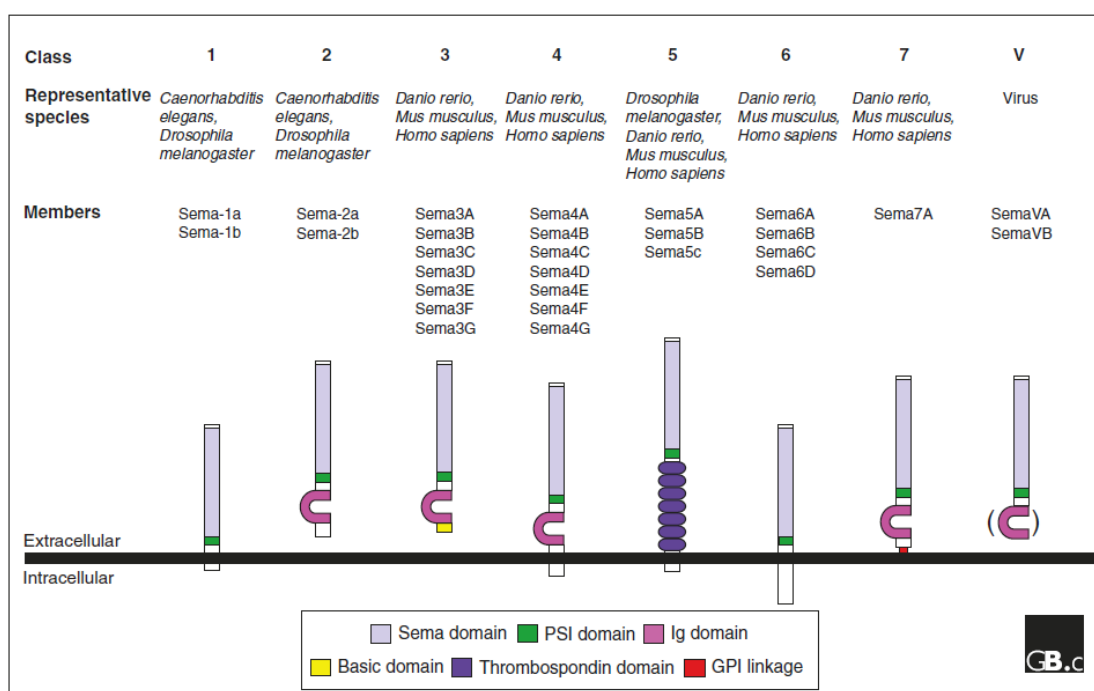


**Slika 8.** Rasprostranjenost (A) i genotipska distribucija (B) HCV-a u Europi (preuzeto od: Petruzziello i sur. 2016) G1; G2; G3; G4; G5; G6 - genotipovi HCV-a

## 1.2. Semaforini

Semaforini su velika i raznovrsna porodica topivih i transmembranskih glikoproteina, strukturno i funkcionalno evolucijski očuvanih kod velikog broja vrsta. Prvi otkriveni semaforin, transmembranski semaforin-1A (SEMA-1A; prvotno nazvan *Fasciclin IV*), detektiran je tijekom istraživanja neuralnog razvoja skakavca (Kolodkin i sur. 1992). Nakon toga, otkriven je čimbenik koji zaustavlja rast aksona u mozgu pileta (topivi SEMA-3A, originalno nazvan *Collapsin*) a zatim specifični antigen na površini eritrocita (GPI-vezani semaforin SEMA-7A poznat i kao CDw108) i T-limfocitni antigen CD100 (SEMA-4D) (Bougeret i sur. 1992).

Geni za veliki broj različitih semaforina pronađeni su kod većine životinja i virusa (ne i kod biljaka i praživotinja), a dijele se u 8 glavnih klasa, 1-7 i V (Slika 9). Klase 3-7 prisutne su kod kralježnjaka, klase 1 i 2 kod beskrležnjaka, a klasa V samo kod virusa. Geni koji kodiraju za semaforine nalaze se u različitim dijelovima genoma, najčešće sadrže nekoliko egzona unutar svakog gena i gotovo svi se alternativno prekrajaju. Genetička raznolikost unutar porodice semaforina vrlo je velika, pri čemu se pojedini članovi međusobno razlikuju u više od 50% aminokiselinskog sastava.



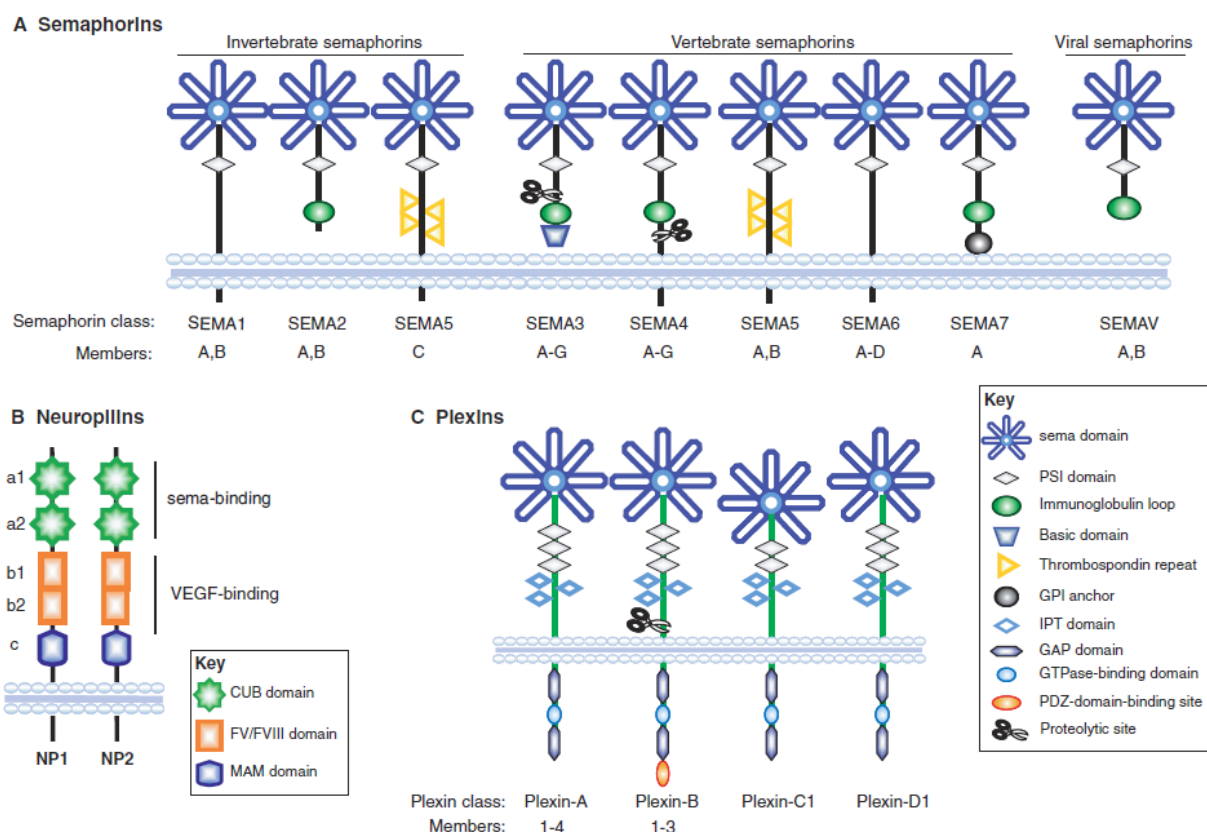
**Slika 9.** Klasifikacija i strukture članova porodice semaforina (preuzeto od: Yazdani i Terman 2006)



Iako se međusobno razlikuju u sekvenci i općoj strukturi, svi članovi porodice semaforina posjeduju očuvanu izvanstaničnu domenu od otprilike 500 aminokiselina ("sema" domena). Osim niza visoko očuvanih aminokiselinskih sekvenci, građena je od velikog broja cisteinskih bočnih ogranka koji međusobno formiraju brojne disulfidne mostove, te formira vrlo specifičnu strukturu  $\beta$ -propelera karakterističnu za proteine s raznovrsnim funkcijama poput integrina i receptorskih tirozinskih kinaza (Gherardi i sur. 2004). Upravo je sema domena ključna komponenta preko koje semaforini ostvaruju svoje interakcije (dokazano na istraživanjima aksonskog navođenja putem SEMA-3A). Direktno pored sema domene nalazi se pleksin-semaforin-integrin (PSI) domena također bogata cisteinskim bočnim ograncima i karakteristična za sve semaforine osim klase V (Bork i sur. 1999).

Unatoč spomenutim zajedničkim karakteristikama, pojedini semaforini međusobno se razlikuju u načinu povezivanja sa staničnom membranom, pa tako mogu biti topivi, transmembranski ili vezani preko glikozil-fosfatidilinozitola (kod semaforina klase 7). Također mogu sadržavati dodatne motive poput domena nalik imunoglobulinima, sekvence visoko bazičnih aminokiselina (semaforini klase 3) ili više ponavljanja trombospondinskih domena (semaforini klase 5). Ove dodatne karakteristike zaslužne su za individualne funkcije koje obavljaju pojedini semaforini, a neki od njih poput SEMA-4D mogu se dalje procesirati u topive forme proteolitičkom degradacijom.

Receptori visokog afiniteta za semaforine uključuju pleksine i neuropiline (Slika 10). Identificirano je 9 gena za pleksine kod kralježnjaka te su podijeljeni u 4 podskupine: pleksin-A (1-4), pleksin-B (1-3), pleksin-C1 i pleksin-D1. Poput njihovih liganada i oni imaju sema domenu na izvanstaničnoj strani, nekoliko PSI domena te 3 IPT domene, dok se s citoplazmatske strane nalaze strukture nalik GTPaza-aktivirajućim proteinima (GAP) koje kataliziraju inaktivaciju R-Ras monomerne GTPaze (Oinuma i sur. 2004). Neuropilini (NP1 i NP2), pronađeni isključivo kod kralježnjaka, transmembranski su proteini koji služe kao koreceptori za semaforine klase 3 i članove porodice vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF).



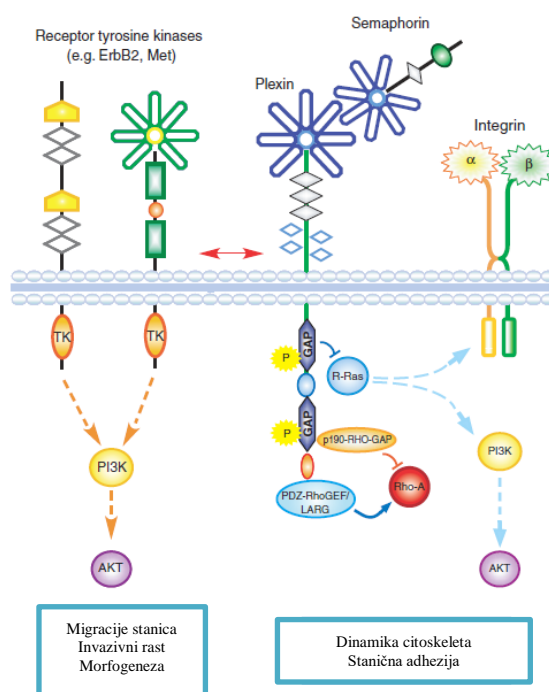
**Slika 10.** Semaforini i semaforinski receptori (pleksini i neuropilini) (preuzeto od: Capparuccia i Tamagnone 2009)

Semaforini kralježnjaka koji su vezani uz membranu također se vežu direktno na pleksine dok topivi semaforini (klase 3) trebaju i neuropiline kao obvezne koreceptore (jedina iznimka je SEMA-3E). Dodatne transmembranske molekule pronađene u receptorskim kompleksima u interakciji s pleksinima i neuropilinima uključuju L1CAM (engl. “*L1 cell-adhesion molecule*”), receptorske tirozinske kinaze (RTK), receptore različitih faktora rasta i dr. (Toyofuku i sur. 2007). Osim semaforina opisani su i drugi ligandi neuropilina poput faktora rasta fibroblasta 2 (FGF2), faktora rasta hepatocita (HGF) i galektina-1 (Gal-1), a otkriveno je i da neuropilini formiraju komplekse s dodatnim površinskim receptorima poput  $\beta 1$  integrina i transformirajućim faktorom rasta  $\beta 1$  (TGF-  $\beta 1$ ) (Glinka i Prud’homme, 2008).

Semaforinski receptori aktiviraju široki spektar unutarstaničnih signalnih puteva (Slika 11). Glavnu funkciju imaju pleksini dok se utjecaj neuropilina (osim uloge u vezanju liganada) još istražuje. Iako pleksini nemaju intrinzičnu kinaznu aktivnost, mogu aktivirati asociirane tirozinske kinaze i vlastiti GAP potencijal te na taj način regulirati dinamiku citoskeleta, funkcije integrina, staničnu adheziju i migraciju.

Većina istraživanja o semaforinskim signalnim kaskadama rađena je na prototipovima SEMA-3A i SEMA-4D u neuronima i endotelnim stanicama, a smatra se da su ti putevi prisutni i u ostalim staničnim tipovima. Dokazano je da semaforini reguliraju funkciju integrina, heterodimernih površinskih receptora koji vežu stanice za izvanstanični matriks, što je središnji događaj u procesima staničnog rasta i preživljenja, pokretljivosti i apoptoze (Hanahan i Weinberg, 2000). To se ostvaruje preko destabilizacije monomerne GTP-aze R-Ras koja održava integrine aktiviranim, formira fokalne adhezije i međustanične veze, te tako doprinosi staničnim migracijama i invazivnosti (Negishi i sur. 2005). Osim R-Ras plexini reguliraju i malu GTP-azu RhoA preko sekundarnih glasničkih faktora asociраних s citoplazmatskom domenom i na taj način, preko reorganizacije komponenata citoskeleta, koordiniraju staničnim gibanjima.

Neki semaforini mogu aktivirati veći broj, ponekad oprečnih, signalnih puteva ovisno o receptorskom kompleksu. U eksperimentu s maligno-transformiranim stanicama dojde prisutnost dviju različitih kinaza imala je dvojak efekt na aktivnost RhoA potaknute sa SEMA-4D, promovirajući ili inhibirajući kemotaksiju ovisno o uvjetima eksperimenta. Sličan efekt zabilježen je i sa SEMA-7A čiji se utjecaj na adheziju, odnosno migraciju, mijenjao ovisno o različitim komponentama receptorskog kompleksa (Scott i sur. 2008). Oba primjera govore u prilog stanično-specifične signalizacije iako sam molekularni mehanizam još nije poznat.



**Slika 11.** Semaforinski receptori i unutarstanični signalni putevi (preuzeto od: Capparuccia i Tamagnone 2009)

### 1.2.1. Semaforin-4D

Semaforin-4D (SEMA-4D/CD100, prethodno poznat kao Sem J, G ili C) je transmembranski glikoprotein tipa I od 150 kDa koji se klasificira u skupinu neuroloških i imunoloških semaforina klase 4. Ljudski gen za SEMA-4D kodira sintezu proteina koji sadrži 862 aminokiseline što uključuje signalnu sekvencu (21 aminokiselina), izvanstaničnu domenu (713 aminokiselina), transmembranski segment (21 aminokiselina) i citoplazmatski rep (107 aminokiselina). Izvanstanična domena sadrži jednu "sema", PSI (pleksin-semaforin-integrin) i imunoglobulinu-nalik domenu, a u strukturnom smislu pokazuje 85% zajedničkih aminokiselinskih sekvenci sa mišjim semaforinskim analogom (Janssen i sur. 2010). SEMA-4D aktivan je kao homodimer, a proteolitičkom aktivacijom pomoću metaloproteinaza (poput TACE/ADAM17 i MMP-14) prevodi se u topivu aktivnu formu od 120 kDa koja također dimerizira.

SEMA-4D, kojeg sintetiziraju T-limfociti, aktivirani-B limfociti i dendritičke stanice, u imunološkim procesima djeluje preko receptora slabog afiniteta CD72 koji iskazuje inhibicijska svojstva za antigen-prezentirajuće stanice. Vezanje semaforina na receptor onemogućuje inhibicijski učinak CD72 što rezultira pojačanom proliferacijom B-limfocita, diferencijacijom makrofaga i dendritičkih stanica te snažnom aktivacijom T-limfocita.

U središnjem živčanom sustavu, SEMA-4D i njegov receptor visokog afiniteta pleksin-B1 eksprimirani su u nekoliko regija mozga, a njihova interakcija pomaže kod aksonskog navođenja neurona u razvoju (Worzfeld i sur. 2004). Tijekom razvoja SEMA-4D također aktivira pleksin-B2 što dodatno stimulira i usmjerava neuronalne migracije.

Utjecaj semaforina-4D zabilježen je i u procesima karcinogeneze. Sintetiziraju ga makrofagi pri čemu se veže na pleksine-B1 endotelnih stanica i tako stimulira angiogenezu u tumorskom mikrokolišu. Iako su ovi rezultati ukazivali na moguću ulogu semaforina-4D u poticanju metastatskih procesa, istraživanja na drugim modelima karcinoma (npr. jajnika) ukazuju na mogući antiproliferacijski učinak na maligne stanice (Lu i sur. 2012). Važnu ulogu u signalizaciji i ostvarenju biološkog učinka semaforina-4D imaju i koreceptori poput Met i ErbB2 koji, u interakciji s pleksinima, modificiraju biološke funkcije semaforina-4D *in vitro*.

### 1.2.2. Semaforin-6D

Semaforin-6D (SEMA-6D), molekulske mase 135 kDa, član je skupine semaforina klase 6 s primarnom ulogom u biološkim funkcijama aksona. Četiri poznata semaforina koji pripadaju ovoj klasi transmembranski su glikoproteini tipa I koji dijele oko 40% aminokiselinskog sastava i vežu specifične pleksin-A receptore neovisno o prisutnosti neuropilina (Zhou i sur. 2008). SEMA-6D eksprimiran je u srčanoj cijevi te u mozgu i kralježničkoj moždini tijekom razvoja. Postnatalno je široko eksprimiran, uključujući neurone, limfocite, dendritičke stanice i osteoklaste dok su mozak, bubreg, posteljica te srčani i skeletni mišići mjesta najviše ekspresije mRNA.

Najčešća ljudska izoforma SEMA-6D od ukupno 1073 aminokiselina sadrži signalnu sekvencu (21 aminokiselina), izvanstaničnu domenu (uključujući sema i PSI domene, 642 aminokiselina), transmembransku sekvencu (21 aminokiselina) i citoplazmatsku komponentu (390 aminokiselina, sličnost sa mišjim homologom veća je od 95%). Alternativnim prekrajanjem nastaju izoforme kojima nedostaju sekvence između aminokiselina 570 i 644 ili sadrže insercijsku sekvencu koja kodira za 13 aminokiselina na poziciji 549 (sve navedene varijacije direktno utječu na funkcionalnost PSI domene). Postoji i rijetka izoforma ovog proteina od 476 aminokiselina, skraćena iza sema domene (Qu i sur. 2002). Sve su izoforme prisutne u mozgu, ali i različito eksprimirane u drugim tkivima.

Tijekom razvoja kralježničke moždine, SEMA-6D i SEMA-6C zajedno se eksprimiraju te putem interakcije sa pleksin-A1 receptorima usmjeravaju periferne neurone mehanizmima odbijanja. SEMA-6D ključan je za morfogenezu srčanog ventrikula pileta upravljajući razvojnim procesima preko pleksin-A1 receptora. Također sudjeluje u preživljenju i izbjegavanju kontaktne inhibicije tumorskih stanica plućnog mezotela. Aktivan je i u imunološkim odgovorima preko stimulacije T-limfocita i dendritičkih stanica, te u regulaciji homeostaze kostiju interakcijom s osteoklastnim pleksinom-A1. Iako je upravo pleksin-A1 glavni posrednik u SEMA-6D signalnim putevima, u receptorskom kompleksu važnu ulogu imaju i receptorske tirozinske kinaze poput VEGFR2 (Catalano i sur. 2009).

### 1.2.3. Semaforin-3C

Semaforin-3C (SEMA-3C, prethodno SemaE) jedan je od 6 sekretornih semaforina klase 3 koji međusobno dijele 40–50% aminokiselinskog sastava. Semaforini klase 3 snažni su kemotaktični proteini koji sudjeluju u usmjeravanju aksona i krvnih žila tijekom razvoja, a smatra se da im je ekspresija povišena tijekom onkogeneze (Neufeld i sur. 2005).

Ljudski SEMA-3C (751 aminokiselina) izrazito je modularno građen. Sadrži signalnu sekvencu od 20 aminokiselina, N-terminalnu sema domenu koja formira strukturu  $\beta$ -propelera sličnu onoj kod integrina (oko 500 aminokiselina), cisteinski čvor, proteolitičko mjesto furinskog tipa, domenu nalik imunoglobulinu i C-terminalnu bazičnu domenu. Kovalentna dimerizacija u kombinaciji s proteolitičkom obradom C-kraja nužni su za aktivnost svih semaforina klase 3. Semaforini tipa 3 sudjeluju u putevima prijenosa signala preko transmembranskih pleksina, bilo direktno ili u kombinaciji s obližnjim neuropilinskim receptorima, pa tako SEMA-3C signalizacija uključuje pleksin-D1 te neuropilin 1 ili neuropilin 2 u receptorskom kompleksu (Gitler i sur. 2004).

SEMA-3C eksprimiran je u motoričkim neuronima somita, plućnim začecima i u stanicama neuralnog grebena tijekom rane embriogeneze, a također može aktivirati integrine u određenim stanicama. Osim mehanizama molekularnog odbijanja ponekad djeluje i kao kemoatraktant. Tijekom razvoja živčanog sustava ovo svojstvo uspješno komplementira odbijajuće djelovanje SEMA-3A u susjednim staničnim slojevima. Jedan od primjera je sudjelovanje u procesu migracije stanica neuralnog grebena nasuprot oprečnom djelovanju semaforina-6A i -6B (Toyofuku i sur. 2008). Ukoliko dođe do mutacija u genima za SEMA-3C ili pleksin-D1 odnosno narušavanja interakcija između semaforina i neuropilina, to uglavnom rezultira s poremećajima u neuralnom i kardiovaskularnom razvoju te smrtnim ishodom.

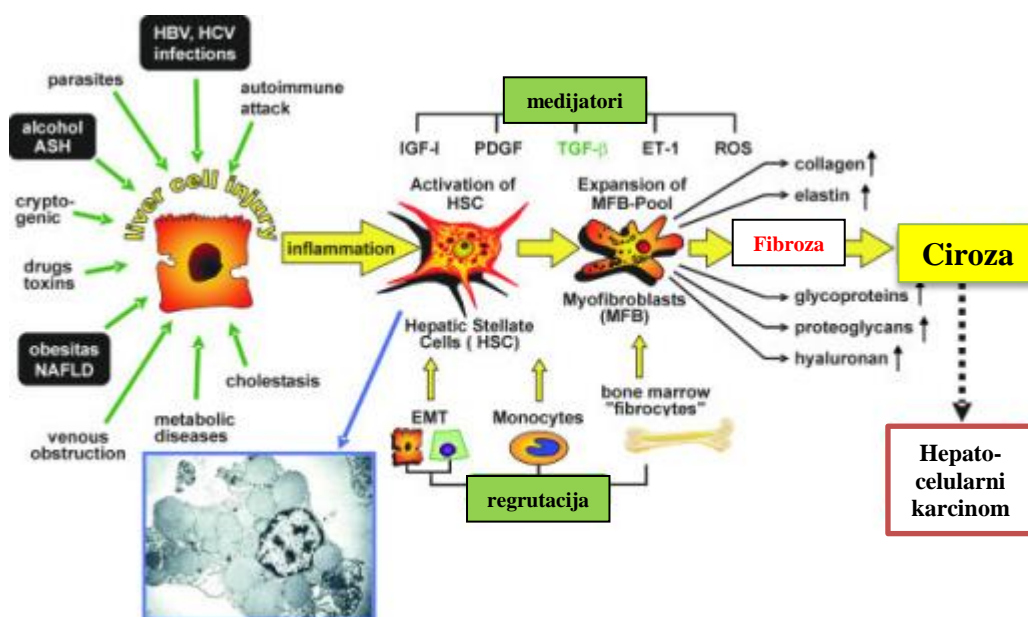
#### 1.2.4. Semaforin-7A

Semaforin-7A (SEMA-7A, oznaka CD108, prethodno Sema K1 ili Sema L) je glikoprotein mase 80 kDa usidren na staničnoj membrani pomoću glikozil fosfatidilinozitola. Također je poznat kao John Milton Hagen (JMH) antigen na ljudskim eritrocitima. SEMA-7A jedini je otkriveni član klase 7, odnosno jedini semaforin vezan za staničnu membranu putem GPI mosta. Ekspresija mu je uglavnom koncentrirana u mozgu, slezeni i timusu (Holmes i sur. 2002).

Ljudski gen *Sema7A* kodira signalnu sekvencu od 44 aminokiselina, izvanstaničnu domenu s uključenim sema i imunoglobulinu-nalik domenama (604 aminokiselina) te signalnu sekvencu za GPI usidrenje od 18 aminokiselina. Sema domena sadrži RGD motiv (Arg-Gly-Asp tripeptid) preko kojeg se ostvaruje kontakt sa integrinima. Iako veže i često se koekspirira s pleksinom-C1, brojne aktivnosti SEMA-7A ovise i o interakciji s  $\beta$ 1-integrinima. Iz tog razloga SEMA-7A signalizacija može imati veći broj različitih ili oprečnih efekata ovisno o strukturi receptorskog kompleksa (Scott i sur. 2008).

SEMA-7A je imunološki semaforin, eksprimiran i aktivan na CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> timocitima, aktiviranim T-limfocitima, makrofagima i mikroglia stanicama. T-limfocitni SEMA-7A reagiraju s monocitima stimulirajući kemotaksiju, biosintezu proupalnih citokina i diferencijaciju dendritičkih stanica (Suzuki i sur. 2007). Međutim, SEMA-7A suprimira signalizaciju T limfocitnog receptora promovirajući njegovu internalizaciju u citosol i na taj način regulira imunološke reakcije T-limfocita. U stanicama pluća i jetre, sinteza SEMA-7A aktivira se kao dio signalnog puta transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) i doprinosi razvoju fibroze (Slika 12) (Kang i sur. 2007).

Iako je prvenstveno imunološki semaforin, SEMA-7A, poput ostalih članova porodice, sudjeluje i u nekim drugim procesima. Eksprimira se na pre-osteoblastima i osteoklastima gdje potiče migraciju i fuziju (Delorme i sur. 2005); na keratinocitima stimulira razmještanje i dendritičnost melanocita; te na pojedinim neuronima, npr. modulirajući rast aksona tijekom razvoja olfaktornog trakta.



Slika 12. Model patogeneze jetrene fibroze (modificirano prema: Gressner i sur. 2007)

### 1.3. Ciljevi istraživanja

Ciljevi istraživanja su bili:

- (1) Odrediti koncentraciju semaforina-4D, -6D, -3C i -7A u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C metodom enzimskog imunotesta i usporediti je s koncentracijama u serumu osoba s kroničnom infekcijom hepatitisom B (HBV) i zdravim kontrolama.
- (2) Analizirati moguću povezanost između koncentracija pojedinih semaforina i kinetike virusne replikacije, stupnja fibroze te genotipa HCV-a.



## 2. Materijali i metode

### 2.1. Ispitanici i biološki uzorci

U istraživanje su bile uključene 43 osobe s kroničnim hepatitisom C, 10 osoba s kroničnom HBV infekcijom i 10 zdravih kontrola. Korišteni su ostatni uzorci seruma biobanke Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. Uzorci periferne krvi ispitanika uzeti su venepunkcijom i prikupljeni u sterilne epruvete bez antikoagulansa te ostavljeni na sobnoj temperaturi 15 – 30 minuta. Serum je odvojen centrifugiranjem pri  $2000 \times g$  10 minuta, a dobiveni supernatanti pipetirani u sterilne epruvete, razdijeljeni u alikvote od 0.5 mL i pohranjeni pri  $-20^{\circ}\text{C}$  (za kvantifikaciju RNA HCV i genotipizaciju virusa) odnosno na  $-80^{\circ}\text{C}$  za kvantifikaciju semaforina.

### 2.2. Kvantifikacija RNA HCV

Za kvantifikaciju RNA HCV (viremija) korištena je standardizirana metoda kvantitativnog PCR (qPCR) u stvarnom vremenu (Abbott RealTime HCV test, Abbott Molecular, USA) optimizirana za biološke uzorke seruma i plazme uz primjenu automatiziranih instrumenata za ekstrakciju nukleinskih kiselina (m2000sp, Abbott Molecular) i lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (real-time PCR) s reverznom transkripcijom (m2000rt, Abbott Molecular) sukladno uputama proizvođača (Slika 13). Uzorci seruma otopljeni su na sobnoj temperaturi i promiješani na vrtložnoj miješalici. Ukoliko su zamućeni potrebno ih je dodatno centrifugirati oko 5 minuta pri  $2000 \times g$ . Uzorci seruma volumena 0.5 mL zatim se nanose na držač za uzorke instrumenta za ekstrakciju nukleinskih kiselina m2000sp. Automatiziranom tehnologijom magnetskih mikročestica prikuplja se virusna RNA, zatim ispire od nevezanih komponenata uzorka te eluira u jažice mikrotitrarske pločice. Isti instrument potom sastavlja zajedničku smjesu sačinjenu od amplifikacijskih početnica, fluorescentno obilježenih proba za detekciju, termostabilne polimeraze *rTth* i aktivacijskog reagensa, te je pipetira na mikrotitracijsku pločicu s eluiranim

RNA HCV molekulama. Pločica se zatim prenosi u instrument m2000rt u kojem se izvodi reverzna transkripcija (RT), amplifikacija real-time PCR-om i kvantifikacija RNA HCV. Proba za detekciju RNA HCV sastoji se od kratkog linearnog oligonukleotida s fluoroforom na 5' kraju i prigušivačem (engl. „quencher“) na 3' kraju. Početnice za PCR i proba za detekciju specifični su za dio visoko očuvane 5' netranslatirajuće regije (5' UTR) genoma HCV-a odabrane kako bi osigurala detekciju svih genotipova virusa. U odsutnosti ciljne sekvence fluorescencija je prigušena, a kod uspješne hibridizacije dolazi do emisije svjetlosti koju detektira skenerska komponenta uređaja. Osim navedenih oligonukleotida u testu se koristi i sekundarni set početnica te proba obilježena alternativnim fluoroforom u svrhu detekcije interne kontrole (transkript gena za hidroksipiruvat reduktazu iz bundeve) koja se automatski dodaje u svaki uzorak tijekom ekstrakcije RNA HCV, a služi za validaciju procesa te kao referentna vrijednost u fazi kvantifikacije. To omogućuje simultano praćenje oba amplificirana produkta tijekom svakog ciklusa, a onaj ciklus u kojem dolazi do pojave fluorescencije proporcionalan je logaritmu koncentracije RNA HCV u uzorku. Rezultati se interpretiraju pomoću informatičkog algoritma „Abbott RealTime HCV m2000 ROW System Combined Application“. Donja granica detekcije ovog testa iznosi 12 IU/mL s vjerojatnošću  $\geq 95\%$  (IU – standardizirana međunarodna jedinica RNA HCV kvantifikacije) a dinamički raspon 12 –  $10^8$  IU/mL.



**Slika 13.** „Abbott m2000 REALTIME SYSTEM“ za automatiziranu pripremu uzoraka, amplifikaciju u stvarnom vremenu i detekciju (preuzeto sa: <http://www.hospicaresystems.com/m2000-realtime-system/>)

## 2.3. Određivanje genotipa virusa

Genotip HCV-a u ispitanika određen je primjenom testa *Versant HCV Genotyping assay* (LiPA, Siemens Healthcare, Germany) koji se temelji na kombinaciji PCR i reverzne hibridizacije te identificira genotipove HCV-a 1-6 i više od 15 različitih podtipova.

### 2.3.1. Izolacija RNA HCV

Za izolaciju RNA HCV korišten je “QIAamp DSP Virus Kit” (Qiagen, Njemačka) (Tablica 3) prema uputama proizvođača. Sve vrijednosti u protokolu odnose se na pojedinačan uzorak. Prije početka uzorke sam ostavio na sobnoj temperaturi 30 min a zatim dobro promiješao na vrtložnoj miješalici. Pipetirao sam 75  $\mu$ L proteaze QIAGEN u epruvetu za lizu te zatim dodao 500  $\mu$ L uzorka seruma. Nakon toga sam dodao još 500  $\mu$ L pufera za lizu, vorteksirao 20 sekundi i inkubirao reakcijsku smjesu na termo bloku (56°C 15 min). Po završetku inkubacije u epruvetu za lizu sam dodao 600  $\mu$ L 96% etanola, ponovno vorteksirao 20 sekundi te ostavio na sobnoj temperaturi 5 minuta. Tako pripremljene uzorke sam zatim pipetirao na QIAamp *MinElute* kolone za eluciju spojene na sustav vakuumske pumpe. Pod utjecajem vakuuma lizat prolazi kroz kolonu pri čemu se viralna RNA veže na silikatnu membranu. Nakon završetka dodao sam 600  $\mu$ L pufera za ispiranje 1 i propustio ga kroz kolonu pomoću vakuuma a zatim ponovio isti postupak sa 750  $\mu$ L pufera za ispiranje 2 te sa 750  $\mu$ L 96% etanola. Po završetku vakuumiranja, kolone za eluciju sam prenio u epruvete za ispiranje i centrifugirao pri  $20000 \times g$  1 minutu kako bi se membrane u potpunosti osušile. Konačno, kolone sam stavio u čiste epruvete za eluciju, pipetirao 60  $\mu$ L elucijskog pufera i ostavio na sobnoj temperaturi 5 minuta te ponovno centrifugirao na  $20000 \times g$  1 minutu. Tako dobiveni filtrat sadrži viralnu RNA. Uzorke sam pohranio na -80 °C do sljedećeg koraka.

**Tablica 3.** Standardizirani reagens za izolaciju viralne RNA (Qiagen, Germany)

<b>QIAamp DSP Virus Kit</b>			
<b>Catalog no.</b>			<b>60704</b>
<b>Number of preps</b>			<b>50</b>
QIAamp MinElute	QIAamp MinElute® Columns with Wash Tubes (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (3 ml)	COL EXT	50
ET	Elution Tubes (1.5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors	VAC CON	50
LT	Lysis Tubes (2 ml)	LYS TUBE	50
WT	Wash Tubes (2 ml)	WASH TUBE	50
AL	Lysis Buffer*	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (concentrate)	WASH BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (concentrate)	WASH BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer† (purple caps)	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent†	QPROT SOLV	4.4 ml
Carrier	Carrier RNA (red caps)	CAR RNA	310 µg
QP	QIAGEN® Protease†	QPROT	1 vial
	Handbook	H B	1

### 2.3.2. Amplifikacija RNA HCV

Za amplifikaciju RNA HCV korišten je “VERSANT HCV Amplification 2.0 Kit (LiPA)” (Siemens Healthcare, Njemačka) (Tablica 4) koji sadrži sve reagense potrebne za reverznu transkripciju i umnažanje 5' UTR i nukleokapsidne regije viralnog genoma. S obzirom da su parovi početnica biotinilirani, amplifikacijom nastaju dva različita biotinilirana DNA fragmenta duljina 240 (5' UTR regija) i 270 (nukleokapsidna regija) parova baza koji se koriste za genotipizaciju virusa u sljedećem koraku. Komplet uključuje i enzim uracil-N-glikozilazu (UNG) za selektivnu degradaciju kontaminirajućih produkata amplifikacije potencijalno prisutnih u reakcijskoj otopini.

Prije amplifikacije pripremio sam zajedničku smjesu za RT-PCR u sterilnim epruvetama pipetirajući komponente kompleta u omjeru: 290 µL AMP MIX i 45 µL ENZ MIX za svakih 10 ispitivanih uzoraka. Za to vrijeme svi su materijali i reagensi držani na ledu. Pripremljenu zajedničku smjesu sam resuspendirao pipetom, kratko vorteksirao te dodao po 30 µL u svaku reakcijsku epruvetu. Pipetirao sam po 20 µL izolirane RNA iz prethodnog koraka u reakcijske epruvete sa zajedničkom smjesom, inkubirao 10 minuta na

sobnoj temperaturi (radi kontrole kvalitete reakcije aktivnošću enzima UNG) te ih stavio u termociklički amplifikator *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, UK). Termalni profil uređaja kalibriran je prema uputama proizvođača (Tablica 5). Po završetku postupka, reakcijske epruvete sam izvadio iz uređaja i amplikone pohranio na -20 °C.

**Tablica 4.** Standardizirani reagens za amplifikaciju 5' UTR i nukleokapsidne regije HCV genoma (Siemens, Germany)

Komponenta	Količina	Opis	Skladištenje
ENZ MIX (smjesa enzima)	4 × 45 µL	Sadrži reverzne transkriptaze Sensiscript i Omniscript, HotStarTaq polimerazu i uracil-N-glikozilazu	-25°C do -15°C
AMP MIX (amplifikacijska smjesa)	1 × 1.4 mL	Sadrži sintetske oligonukleotide u puferu s dNTP/dUTP i MgCl <sub>2</sub>	-25°C do -15°C

**Tablica 5.** Termalni profil optimiziran za *GeneAmp PCR System* (Applied Biosystems, UK)

Korak	Temperatura	Trajanje
(a) Reverzna transkripcija	50°C ± 0.5°C	30 minuta
(b) Početna PCR aktivacija	95°C ± 0.5°C	15 minuta
(c) Denaturacija	95°C ± 0.5°C	30 sekundi
(d) Vezanje početnica	50°C ± 0.5°C	30 sekundi
(e) Elongacija	72°C ± 0.5°C	15 sekundi
Ponoviti korake c do e 39 puta		
Završna elongacija	72°C ± 0.5°C	2 minute

### 2.3.3. Genotipizacija RNA HCV

Za genotipizaciju HCV-a korišten je *Versant HCV Genotype 2.0 Assay* (LiPA, Siemens Healthcare, Germany) dizajniran za identifikaciju HCV genotipova 1 – 6 te 15 podtipova u uzorcima seruma ili plazme. Test je baziran na reverzibilnoj hibridizaciji biotiniliranih DNA PCR produkata, dobivenih RT-PCR amplifikacijom 5' UTR i

nukleokapsidne regije RNA HCV, na imobilizirane oligonukleotidne probe. Probe su vezane na nitrocelulozne trake preko poli(T) repa i specifične su za 5' UTR i nukleokapsidne regije različitih genotipova HCV-a. Nakon hibridizacije, nevezani produkti PCR se ispiru te se dodaje streptavidin s konjugiranom alkalnom fosfatazom koji prepoznaje biotinizirane hibride. Kromogeni supstrat BCIP/NBT potom reagira sa kompleksom streptavidina i alkalne fosfataze pri čemu nastaje ljubičasto/smeđi talog što rezultira specifičnim uzorkom obojenja nitroceluloznih traka. Nakon početnog nanošenja uzoraka, slijedi niz inkubacija i ispiranja prema uputama proizvođača nakon čega se trakice izvade pincetom, dobro posuše i čuvaju u tami do analize. Rezultati se interpretiraju pomoću algoritma koji temeljem analize pozicije biljega na nitroceluloznoj membrani omogućuje identifikaciju genotipova i podtipova HCV-a.

## 2.4. Određivanje koncentracije semaforina

Za određivanje koncentracije semaforina u uzorcima seruma korišten je ELISA – enzimski imunotest (Human Semaphorin-4D, -6D, -3C, -7A ELISA Kit, MyBioSource, CA, USA). ELISA je enzimski imunotest koji se temelji na specifičnoj reakciji antigena i antitijela u standardnim mikrotitracijskim pločicama. Antitijela specifična za analit imobilizirana su u jažicama. Za vezna mjesta na antitijelima kompetiraju analit iz uzorka i enzimom obilježeni analit-kompetitor. Ispiranjem se uklanja višak analita obilježenog enzimom, te se dodaje bezbojni supstrat koji pod utjecajem enzima mijenja boju. Boja se mjeri spektrofotometrijski, a intenzitet boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji analita u početnom uzorku.

### 2.4.1. Određivanje koncentracije semaforina-3C

Prije početka postupka sve uzorke i komponente kompleta (Tablica 6) ostavio sam na sobnoj temperaturi 30 minuta. Zatim sam pripremio 1000 mL radne otopine za ispiranje (1×) razrjeđivši 10 mL stock otopine (100×) sa 990 mL deionizirane vode miješajući dok se kristalići u koncentratu nisu u potpunosti otopili.

Bočice sa standardima sam protresao, a otopine resuspendirao pipetom prije nanošenja na mikrotitarsku ploču. U jažice sam zatim dodao 6 standarda poznatih koncentracija volumena 100  $\mu$ L u duplikatima, 4 slijepe probe volumena 100  $\mu$ L (PBS, pH 7.0-7.2) te 63 uzoraka seruma volumena 100  $\mu$ L (43 HCV, 10 HBV i 10 zdravih kontrola). Nakon toga sam višekanalnom pipetom dodao 50  $\mu$ L konjugata u sve jažice (osim slijepih proba) i dobro promiješao. Ploču sam poklopio i inkubirao 1 sat na 37°C. Po završetku inkubacije sadržaj sam uklonio i započeo procesom ispiranja jažica (jažice se u potpunosti ispune s 1 $\times$  otopinom za ispiranje i nakon par minuta izliju, a postupak se ponavlja 5 puta). Nakon ispiranja ploča se okrene i suši na papirnatim ručnicima do potpune suhoće (važno za dobar rezultat testa). U plastičnoj posudi sam zatim izmiješao 6 mL supstrata A i 6 mL supstrata B te pipetirao po 100  $\mu$ L otopine u svaku jažicu, uključujući i slijepe probe. Ploču sam poklopio i inkubirao 15 minuta na 37°C. Nakon inkubacije dodao sam 50  $\mu$ L “stop” otopine u svaku jažicu i dobro promiješao te odredio apsorbanciju pri 450 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča “Multiskan FC Microplate Photometer” (ThermoFisher Scientific, USA). Na temelju poznatih koncentracija standarda i njihovih apsorbancija, te pomoću internog software-a uređaja konstruirana je baždarna krivulja iz koje su očitane vrijednosti koncentracija semaforina u uzorcima. Osjetljivost testa iznosi 0.1 ng/mL s rasponom detekcije od 0 – 10 ng/mL.

**Tablica 6.** Komplet “Human Semaphorin-3C (SEMA-3C) ELISA kit” (MyBioSource, USA)

	MATERIALS	SPECIFICATION
1	MICROTITER PLATE	96 wells
2	ENZYME CONJUGATE	6.0 mL
3	STANDARD A	0 ng/ml
4	STANDARD B	0.5 ng/ml
5	STANDARD C	1.0 ng/ml
6	STANDARD D	2.5 ng/ml
7	STANDARD E	5.0 ng/ml
8	STANDARD F	10 ng/ml
9	SUBSTRATE A	6 mL
10	SUBSTRATE B	6 mL
11	STOP SOLUTION	6 mL
12	WASH SOLUTION (100 $\times$ )	10 mL
13	BALANCE SOLUTION	3 mL

## 2.4.2. Određivanje koncentracije semaforina-7A

Protokol za kvantifikaciju semaforina-7A vrlo je sličan prethodnom, s manjim razlikama u koncentracijama standarda i korištenim volumenima određenih komponenata kompleta (Tablica 7).

U jažice sam dodao 50  $\mu$ L standarda u duplikatima, 50  $\mu$ L uzoraka i 50  $\mu$ L slijepe probe (PBS, pH 7.0-7.2). Zatim sam pipetirao 100  $\mu$ L konjugata u sve jažice osim slijepih proba te dobro promiješao. Ploču sam poklopio i inkubirao 1 sat na 37°C. Nakon inkubacije uklonio sam sadržaj, jažice isprao 5 puta s 1 $\times$  otopinom za ispiranje i nakon toga ploču osušio na papirnatim ručnicima. U plastičnoj posudi sam izmiješao 6 mL supstrata A i 6 mL supstrata B te dodao po 100  $\mu$ L otopine u svaku jažicu, uključujući slijepe probe. Ploču sam poklopio i inkubirao 15 minuta na 37°C. Nakon inkubacije dodao sam 50  $\mu$ L “stop” otopine u svaku jažicu, dobro promiješao, odredio apsorbanciju pri 450 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča te iz konstruirane baždarne krivulje odredio koncentracije semaforina u uzorcima. Osjetljivost testa iznosi 0.1 ng/mL s rasponom detekcije od 0 – 25 ng/mL.

**Tablica 7.** Komplet “Human Semaphorin-7A (SEMA-7A) ELISA kit” (MyBioSource, USA)

	MATERIALS	SPECIFICATION
1	MICROTITER PLATE	96 wells
2	ENZYME CONJUGATE	10 mL
3	STANDARD A	0 ng/ml
4	STANDARD B	1.0 ng/ml
5	STANDARD C	2.5 ng/ml
6	STANDARD D	5.0 ng/ml
7	STANDARD E	10 ng/ml
8	STANDARD F	25 ng/ml
9	SUBSTRATE A	6 mL
10	SUBSTRATE B	6 mL
11	STOP SOLUTION	6 mL
12	WASH SOLUTION (100 $\times$ )	10 mL
13	BALANCE SOLUTION	3 mL



### 2.4.3. Određivanje koncentracije semaforina-4D i -6D

Protokoli i kompleti reagensa za kvantifikaciju semaforina-4D i -6D međusobno su identični osim reagensa koji sadrži antitijela specifična za pojedini semaforin (Tablica 8).

Kao i kod prethodna dva testa, u jažice sam pipetirao po 50  $\mu$ L duplikata standarda, 50  $\mu$ L uzoraka i 50  $\mu$ L slijepe probe ("sample diluent" kompleta, PBS). Zatim sam dodao 100  $\mu$ L HRP-konjugata (engl."horseradish peroxidase") u sve jažice osim slijepih proba, ploču poklopio i inkubirao 1 sat na 37°C. Nakon inkubacije ploču sam isprao na isti način kao i prethodna dva puta. Pomiješao sam 6 mL kromogene otopine A i 6 mL kromogene otopine B, pipetirao 100  $\mu$ L u sve jažice, te ploču poklopio i inkubirao 15 minuta na 37°C. Po završetku dodao sam 50  $\mu$ L "stop" otopine u svaku jažicu, dobro promiješao, očitao apsorbanciju pri 450 nm i pomoću baždarne krivulje odredio koncentracije semaforina. Osjetljivost oba testa iznosi 0.1 ng/mL s rasponom detekcije od 0.625 – 20 ng/mL.

**Tablica 8.** Komplet "Human Semaphorin-4D/-6D (SEMA-4D/-6D) ELISA kit" (MyBioSource, USA)

	Materials	Specification
1	Microelisa Stripplate	12 $\times$ 8 Strips
2	Standards x 6 vials	0.5 ml $\times$ 6 vials
3	Sample Diluent	6.0 ml
4	HRP-Conjugate Reagent	10.0 ml
5	20 x Wash Solution	25 ml
6	Stop Solution	6 ml
7	Chromogen Solution A	6.0 ml
8	Chromogen Solution B	6.0 ml
9	Closure Plate Membrane	2
10	Sealed Bags	1

Koncentracije standarda od  $S_{VI}$  do  $S_I$  iznose: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ng/ml

## 2.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkog računalnog softverskog paketa „SPSS Statistics“ (IBM, New York, USA; za Windows). Dobiveni rezultati opisani su parametrima deskriptivne statistike: medijanom, minimalnom i maksimalnom vrijednošću, te interkvartilnim rasponom.

Analiza potencijalnog odnosa između koncentracija pojedinih semaforina i kinetike virusne replikacije te stupnja fibroze obavljena je pomoću Spearmanove korelacije. Za ispitivanje razlika u parametrima infekcije ovisno o genotipu virusa, te utvrđivanje statistički značajnih razlika u koncentracijama semaforina između različitih skupina uzoraka proveden je Mann-Whitney U test. U svim provedenim analizama p-vrijednost  $<0.05$  smatrala se statistički značajnom.

### 3. Rezultati

#### 3.1. Ispitanici (demografski, virološki i klinički parametri)

U istraživanje sam uključio 43 osobe s kroničnim hepatitisom C, 10 osoba s kroničnim hepatitisom B i 10 zdravih kontrola. Od ukupno 63 ispitanika, 52% su bili muškarci (33/63), a 48% (30/63) žene. Medijan dobi ispitanika iznosio je 41 godinu (raspon 26 – 61 godina). Kvantifikacijom RNA HCV u serumu određena je viremija < 600 000 IU/mL (tzv. niža viremija) u 56% (24/43) ispitanika, te viremija > 600 000 IU/mL u 44% (19/43) ispitanika. Medijan viremije u bolesnika s kroničnim hepatitisom C iznosio je 1 091 900 IU/mL (raspon 130 042 – 2 351 865 IU RNA HCV/mL seruma). Rezultati genotipizacije HCV-a pokazali su da su 32 (74%) bolesnika s kroničnim hepatitisom C bila zaražena genotipom 1 dok su ostali bolesnici (n=11, 26%) bili zaraženi genotipom 3 (podtipom 3a) HCV-a (Tablica 9). Stupanj fibroze u bolesnika s kroničnim hepatitisom C određen je biopsijom jetre te analizom patohistološkog nalaza prema Ishak-Knodellovom indeksu stadija fibroze F 1-6, s medijanom 3 (raspon 1 - 4).

Tablica 9. Odabrani demografski i virološki parametri ispitanika

Parametar (medijan, raspon)	Ispitanici
<b>Dob (godine)</b>	41 (26-61)
<b>Spol, broj (%)</b>	
<i>Muškarci</i>	33 (52%)
<i>Žene</i>	30 (48%)
<b>Dijagnoza (kronični virusni hepatitis)</b>	
<i>infekcija HCV-om</i>	43 (68%)
<i>infekcija HBV-om</i>	10 (16%)
<i>kontrola</i>	10 (16%)
<b>Genotip HCV-a</b>	
<i>Genotip 1</i>	32 (74%)
<i>Genotip 3 (podtip 3a)</i>	11 (26%)
<b>Viremija (RNA HCV)</b>	
<i>Niža viremija (&lt;600 000 IU/mL RNA HCV)</i>	24 (56%)
<i>Viša viremija (&gt;600 000 IU/mL RNA HCV)</i>	19 (44%)

## 3.2. Određivanje koncentracije semaforina

Koncentracija semaforina-4D, -6D, -3C i -7A u uzorcima seruma bolesnika s virusnim hepatitisima uzrokovanim infekcijom HCV-om i HBV-om te zdravih kontrola određena je metodom enzimskog imunotesta, a rezultati prikazani kao medijani vrijednosti s interkvartilnim rasponima.

### 3.2.1. Kvantifikacija ekspresije semaforina-4D

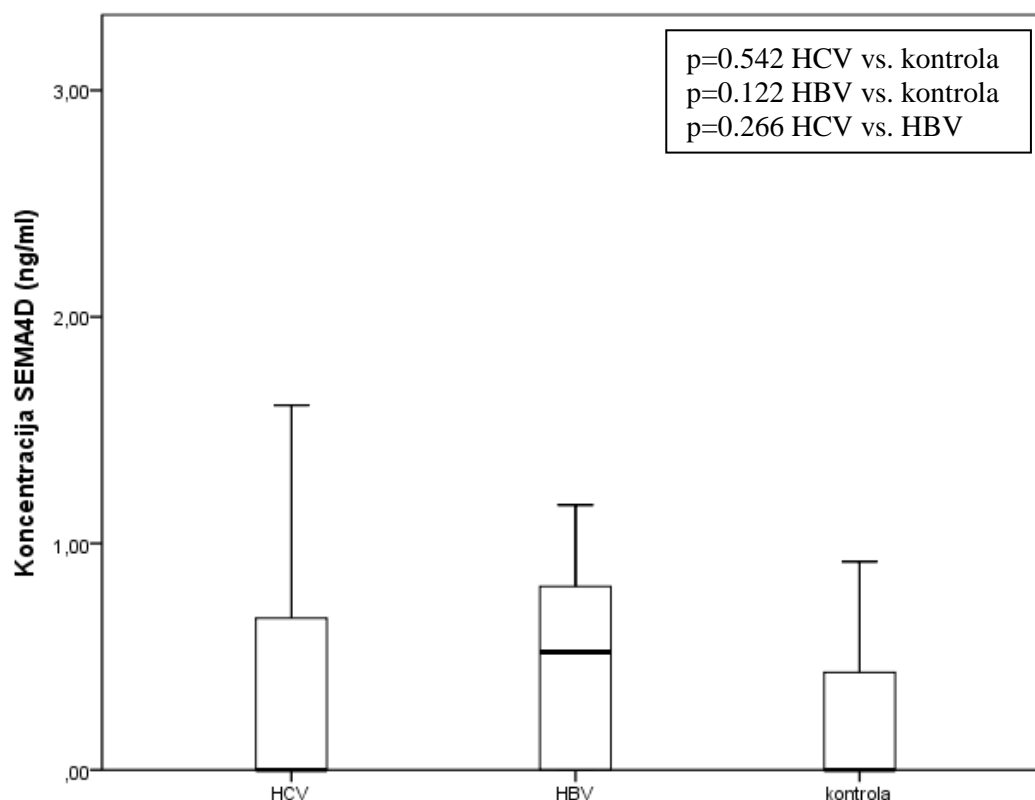
Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji SEMA-4D u uzorcima seruma bolesnika s kroničnim hepatitisom C (medijan 0 ng/ml; IQR 0 – 0.69 ng/ml) i kroničnim hepatitisom B (medijan 0.52 ng/ml; IQR 0 – 0.81 ng/ml) te zdravih kontrola (medijan 0 ng/ml; IQR 0 – 0.45 ng/ml) (Slika 14).

### 3.2.2. Kvantifikacija ekspresije semaforina-6D

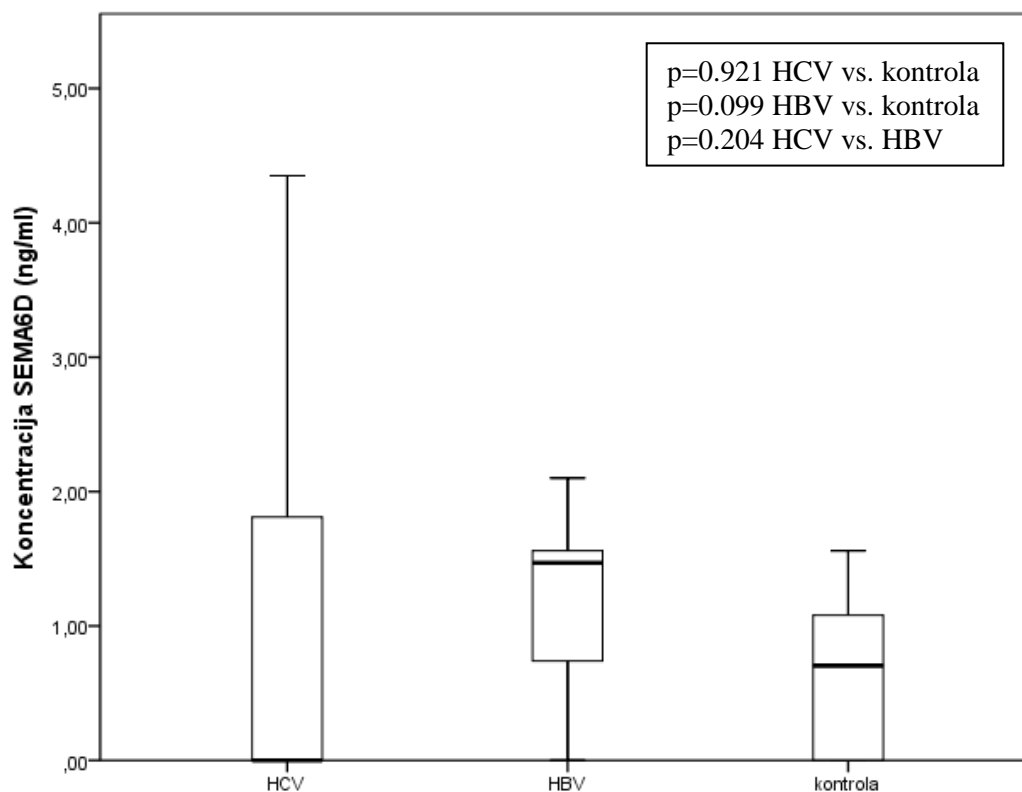
Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji SEMA-6D u uzorcima seruma bolesnika s kroničnim hepatitisom C (medijan 0 ng/ml; IQR 0 – 1.95 ng/ml) i kroničnim hepatitisom B (medijan 1.47 ng/ml; IQR 0.555- 1.585 ng/ml) te zdravih kontrola (medijan 0.705 ng/ml; IQR 0 – 1.185 ng/ml) (Slika 15).

### 3.2.3. Kvantifikacija ekspresije semaforina-3C

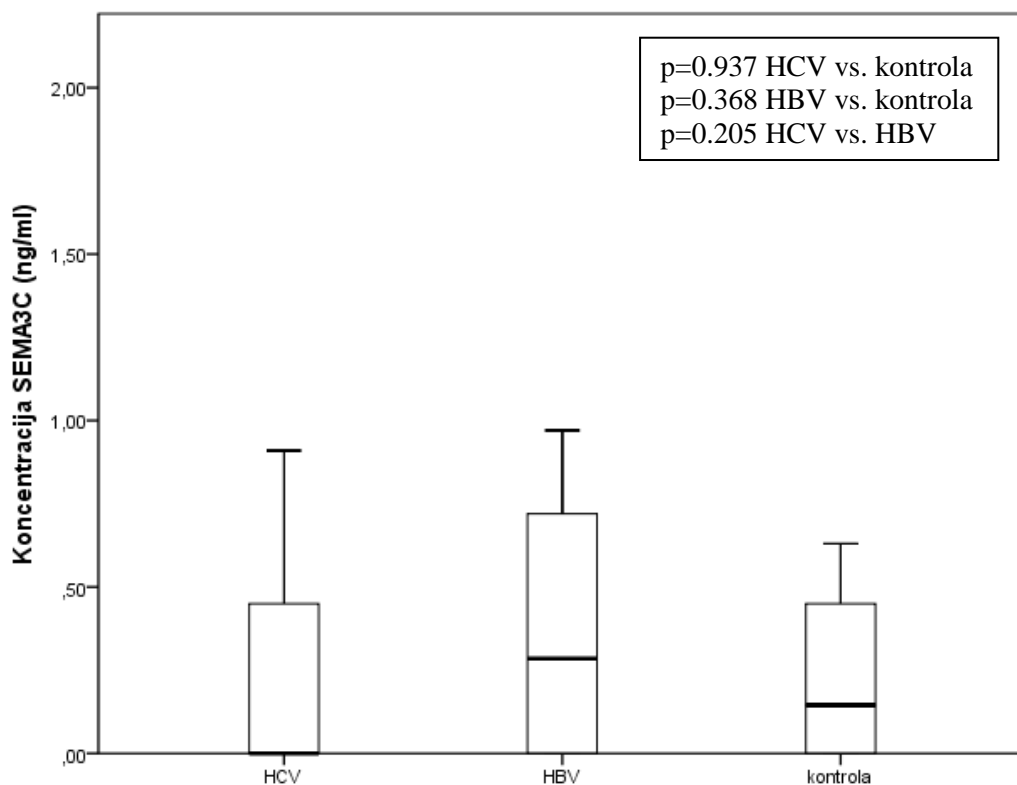
Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji SEMA-3C u uzorcima seruma bolesnika s kroničnim hepatitisom C (medijan 0 ng/ml; IQR 0 – 0.49 ng/ml) i kroničnim hepatitisom B (medijan 0.285 ng/ml; IQR 0 – 0.745 ng/ml) te zdravih kontrola (medijan 0.145 ng/ml; IQR 0 – 0.46 ng/ml) (Slika 16).



**Slika 14.** Koncentracija semaforina-4D u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C i B te zdravih kontrola  
SEMA4D: semaforin-4D; HCV: virus hepatitisa C; HBV: virus hepatitisa B; p: značajnost



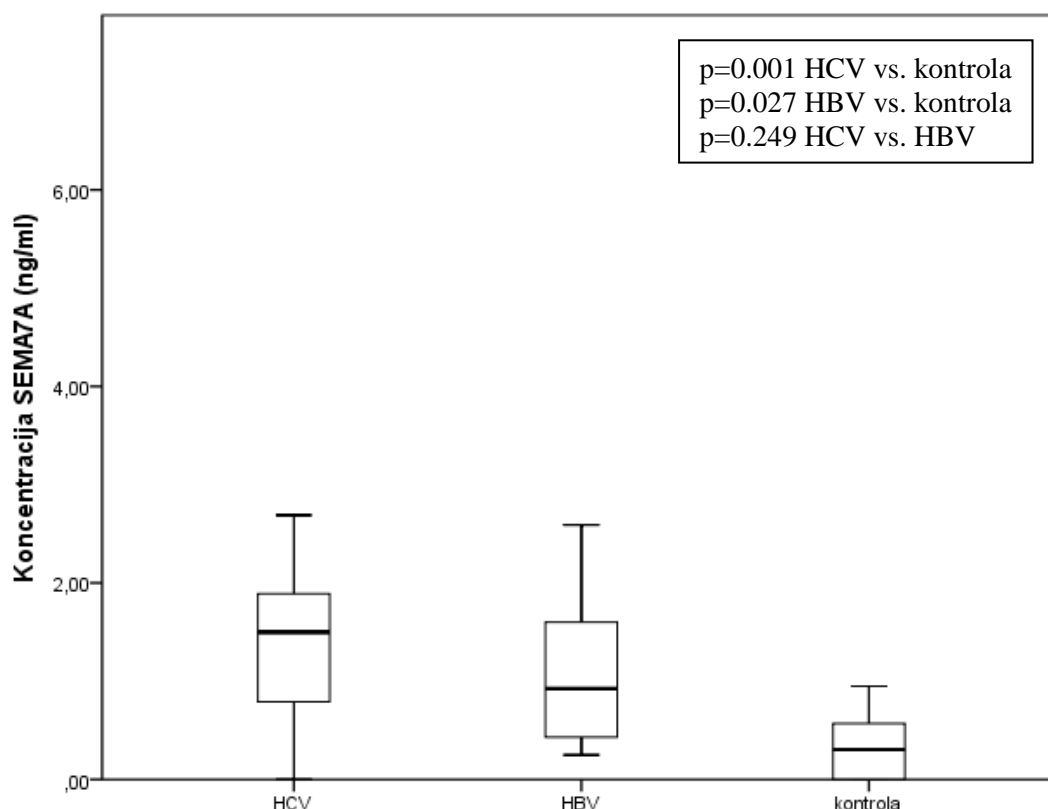
**Slika 15.** Koncentracija semaforina-6D u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C i B te zdravih kontrola  
SEMA6D: semaforin-6D; HCV: virus hepatitisa C; HBV: virus hepatitisa B; p: značajnost



**Slika 16.** Koncentracija semaforina-3C u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C i B te zdravih kontrola  
SEMA3C: semaforin-3C; HCV: virus hepatitisa C; HBV: virus hepatitisa B; p: značajnost

#### 3.2.4. Kvantifikacija ekspresije semaforina-7A

Utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji semaforina-7A između uzoraka seruma bolesnika s kroničnim hepatitisom C (medijan 1.5 ng/ml; IQR 0.75 – 1.9 ng/ml) i zdravih kontrola (medijan 0.305 ng/ml; IQR 0 – 0.645 ng/ml) ( $p=0.001$ ). Također se značajno razlikuje koncentracija semaforina-7A u serumima osoba s kroničnim hepatitisom B (medijan 0.925 ng/ml; IQR 0.4125 – 1.6275 ng/ml) i zdravih kontrola ( $p=0.027$ ). Između uzoraka HCV i HBV pacijenata nije bilo značajne razlike u koncentraciji semaforina-7A (Slika 17).



**Slika 17.** Koncentracija semaforina-7A u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C i B te zdravih kontrola  
SEMA7A: semaforin-7A; HCV: virus hepatitisa C; HBV: virus hepatitisa B; p: značajnost

### 3.3. Analiza korelacije između koncentracije semaforina i odabranih viroloških i kliničkih parametara

Za testiranje moguće povezanosti između koncentracije četiri analizirana semaforina i stope virusne replikacije te stupnja fibroze jetre u bolesnika s kroničnim hepatitisom C korištena je Spearmanova korelacija (Tablica 10). Rezultati ove analize pokazali su da postoji statistički značajna korelacija između ekspresije SEMA-4D i SEMA-6D te viremije (tj. broja IU RNA HCV po ml seruma). Također je utvrđena statistički značajna korelacija između stupnja fibroze jetre i kinetike virusne replikacije. Moguće razlike u ekspresiji semaforina, stupnju fibroze i viremiji infekcije ovisno o genotipu HCV-a analizirane su pomoću Mann-Whitney U testa (Tablica 11). Nisu utvrđene statistički značajne razlike prilikom ispitivanja navedenih parametara.

**Tablica 10.** Korelacije između koncentracije semaforina, stupnja fibroze jetre i stope viremije HCV-a

Korelacije			Stupanj fibroze	Viremija HCV
Spearman's rho	Stupanj fibroze	Koeficijent korelacije	1.000	.319*
		Značajnost (p)	.	.037
		N (broj uzoraka)	43	43
	Viremija HCV	Koeficijent korelacije	.319*	1.000
		Značajnost (p)	.037	.
		N (broj uzoraka)	43	43
	SEMA4D	Koeficijent korelacije	.193	.314*
		Značajnost (p)	.215	.041
		N (broj uzoraka)	43	43
	SEMA6D	Koeficijent korelacije	.239	.411*
		Značajnost (p)	.122	.006
		N (broj uzoraka)	43	43
	SEMA3C	Koeficijent korelacije	.073	.161
		Značajnost (p)	.642	.303
		N (broj uzoraka)	43	43
	SEMA7A	Koeficijent korelacije	.002	.028
		Značajnost (p)	.990	.857
		N (broj uzoraka)	43	43

\* označava statistički značajnu povezanost između parametara ( $p < 0.05$ )

SEMA4D: semaforin-4D; SEMA6D: semaforin-6D; SEMA3C: semaforin-3C; SEMA7A: semaforin-7A

**Tablica 11.** Statistička značajnost razlika u koncentracijama semaforina, stupnju fibroze i viremiji između genotipova HCV-a 1 i 3

Statistički testovi	fibroza	viremija	SEMA4D	SEMA6D	SEMA3C	SEMA7A
Mann-Whitney U	173.500	166.000	141.000	130.000	142.000	126.000
Wilcoxon W	239.500	232.000	669.000	658.000	670.000	654.000
Z-vrijednost (st dev)	-.072	-.278	-1.058	-1.428	-1.056	-1.395
Značajnost (p)	.945	.794	.342	.209	.356	.171

$p < 0.05$  smatra se statistički značajnim

SEMA4D: semaforin-4D; SEMA6D: semaforin-6D; SEMA3C: semaforin-3C; SEMA7A: semaforin-7A



## 4. Rasprava

Rezultati ovog istraživanja dokazali su ekspresiju četiri semaforina (SEMA-3C, SEMA-4D, SEMA-6D i SEMA-7A) u serumu bolesnika s kroničnim virusnim hepatitisom C. Značajna povezanost između koncentracije SEMA-4D i SEMA-6D u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C i stope virusne replikacije ukazuje na moguću ulogu ovih molekula u imunološkom odgovoru HCV-om zaraženih osoba u kroničnoj fazi infekcije. Značajno povećana koncentracija SEMA-7A u bolesnika s kroničnim hepatitisom C i B u odnosu na zdrave kontrole također upućuje na važnost ove molekule u imunoreakciji na HCV i HBV.

Literaturni podaci o učinku infekcije različitim mikroorganizmima (poput HCV-a) na ekspresiju semaforina u zaraženim stanicama ili organizmima kao i o modulaciji signalnih puteva u koje su semaforini uključeni iznimno su oskudni. Stoga je usporedba dobivenih rezultata sa literaturnim podacima kao i njihova evaluacija u tom kontekstu kompleksna. Novija istraživanja različitih funkcija semaforina ipak nedvojbeno pokazuju da ove molekule sudjeluju u širokom spektru fizioloških procesa s posebnim naglaskom na imunologiju.

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da je SEMA-7A iznimno značajan u imunološkim reakcijama (Suzuki i sur. 2007), a njegova uloga u razvoju fibroze funkcionalnog parenhima različitih vrsta tkiva prethodno je dokazana u nekoliko istraživanja (De Minicis i sur. 2013; Gan i sur. 2011).

De Minicis i sur. (2013) analizirali su ulogu SEMA-7A u fibrozi jetre. Istraživanje je provedeno na modelu miševa s funkcionalno inaktiviranim genom za SEMA-7A pri čemu je nastanak fibroze potaknut injiciranjem ugljikovog tetraklorida *in vivo*. Također su analizirani uzorci bioptata jetre miševa i ljudi kao i primarne stanične linije hepatocita uz primjenu metoda Western blota, kvantitativnog RT-PCR-a u stvarnom vremenu i imunohistokemije. De Minicis i sur. (2013) dokazali su visoku razinu ekspresije SEMA-7A u zvjezdastim stanicama jetre (HSC, engl. "*hepatic stellate cells*") kao i ekspresiju njegovog receptora  $\beta$ 1-integrina nakon stimulacije transformirajućim faktorom rasta-beta (TGF- $\beta$ ). Snažna aktivacija ovog signalnog puta dovela je do pojačane ekspresije fibrogenih i upalnih biljega pri čemu se intenzitet reakcije pojačavao paralelno s razvojem fibroze.

U sličnom istraživanju na modelu mišjih pluća Gan i sur. (2011) pokazali su da inhibicija ekspresije SEMA-7A ili onemogućavanje vezanja ovog semaforina na integrinski receptor blokira signalni put potaknut s TGF- $\beta$  koji je uključen u nastanak fibroze. Rezultati ovog istraživanja koji su pokazali ekspresiju SEMA-7A u serumu bolesnika s kroničnim virusnim hepatitisom u skladu su s rezultatima istraživanja Gan i sur. (2011) jer je u većine ispitanika uključenih u istraživanje ekspresije semaforina fibroza jetre bila uznapredovala. Kako je korelacijska analiza pokazala statistički značajnu povezanost između stope virusne replikacije i stupnja fibroze jetre, rezultati ovog istraživanja u skladu su s modelom patogeneze kroničnog virusnog hepatitisa u kojem dolazi do perzistentne virusne replikacije te aktivacije signalnih kaskada moduliranih putem SEMA-7A.

Uz analizu biološke funkcije SEMA-7A u patogenezi fibroze pluća i jetre, analizirana je uloga ovog semaforina i u drugim modelima različitih bolesti. Czopik i sur. (2006) dokazali su da SEMA-7A ima važnu ulogu u negativnoj regulaciji aktivacije T-limfocita pri čemu je povećan broj stanica s deficijentnom ekspresijom SEMA-7A bio povezan s razvojem autoimunih bolesti. Suzuki i sur. (2007) pokazali su važnost SEMA-7A u kontekstu aktivacije T-limfocita koji stimuliraju proizvodnju upalnih citokina kod monocita i makrofaga putem  $\alpha 1\beta 1$  integrina stvarajući tzv. imunološku sinapsu koja predstavlja važnu komponentu imunološkog odgovora. Ovako kompleksna mreža često oprečnih signalnih puteva svakako otežava određivanje precizne uloge SEMA-7A u upalnim imunoreakcijama.

He i sur. (2014) analizirali su ulogu ekspresije SEMA-4D i njegovog receptora CD72 u B-limfocitima analizirajući proces imunoregulacije tijekom kronične infekcije HCV-om, prije i nakon liječenja kombinacijom pegiliranog IFN- $\alpha$  i ribavirina pri čemu su koristili metodu protočne citometrije. Autori su pokazali povećanu ekspresiju SEMA-4D u bolesnika s kroničnim hepatitisom C kao i smanjenje koncentracije SEMA-4D nakon uspješno provedenog liječenja tj. eradicacije virusa. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na aktivaciju B-limfocita tijekom primjene IFN- $\alpha$  pri čemu pojačana ekspresija SEMA-4D omogućuje korekciju narušene homeostaze specifične stanične imunosti i smanjenje replikacijskog potencijala HCV-a. Opaženu povezanost između stope viremije i razine biosinteze SEMA-4D potvrdili su i rezultati našeg istraživanja na razini sistemske proteinske ekspresije u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C.

Li i sur. (2017) istraživali su učinak SEMA-4D na citotoksične T-limfocite tijekom HCV infekcije i nakon primjene IFN- $\alpha$ , kombinacijom protočne citometrije i enzimskih imunotestova. Pokazali su da infekcija HCV-om smanjuje ekspresiju transmembranskog SEMA-4D na površini CD8<sup>+</sup> T-limfocita dok primjena interferona potiče pojačanu sekreciju citokina i citotoksičan učinak CD8<sup>+</sup> T-limfocita putem interakcije SEMA-4D i CD72 receptora na inficiranim stanicama. Obzirom na to da su ispitanici u našem istraživanju bili u kroničnoj fazi infekcije tijekom koje dolazi do perzistentne replikacije HCV-a, pretpostavljam da kontinuirani te nepotpuno učinkovit imunološki odgovor stanica stečene imunosti dovodi do kontinuirane sinteze proupalnih citokina koji održavaju povišenu razinu ekspresije SEMA-4D.

Sličan uzorak ekspresije SEMA-6D i SEMA-4D ukazuje na moguću uključenost u zajedničke signalne putove. O'Connor i sur. (2008) pokazali su značajnu ulogu SEMA-6D u aktivaciji T-limfocita. *In vitro* i *in vivo* stimulacija T-limfocita citokinima dovodi do pojačane biosinteze SEMA-6D u većini stanica ali samo u kasnoj fazi aktivacije. Sukladno tome, inhibicija vezanja SEMA-6D za njegov receptor uzrokovala je inhibiciju proliferacije T-limfocita u kasnoj ali ne i u ranoj fazi aktivacije (što odgovara kliničkom stadiju bolesti ispitanika uključenih u naše istraživanje), a čime je potvrđena uloga SEMA-6D u regulaciji kasne faze imunoloških odgovora.

Osim mehanizama stanične specifične imunosti i urođena imunost ima važnu ulogu u suzbijanju infekcije (Stetson i Medzhitov 2006). Jednu od glavnih komponenata urođene imunosti čine dendritičke stanice koje imaju važnu ulogu u prezentaciji antigena te predstavljaju najznačajniji izvor IFN tipa I u organizmu (subpopulacija plazmacitoidnih dendritičkih stanica). Watarai i sur. (2008) identificirali su receptor PDC-TREM na površini dendritičkih stanica povezan s pleksinom-A1 koji je ključan u signalnom putu sinteze interferona. Ovaj receptor ne može samostalno inducirati njihovu ekspresiju ali vezanjem SEMA-6D na pleksine receptorskog kompleksa dolazi do aktivacije tog signalnog puta što su dokazali u eksperimentima primjene monoklonskih antitijela koja su inhibirala funkciju istraživanih receptora. Sve navedene studije zajedno upućuju na iznimnu važnost SEMA-4D i SEMA-6D u modulaciji imunoloških odgovora domaćina u svim fazama infekcije.

Koncentracija SEMA-3C u serumu bolesnika s virusnim hepatitisima bila je niža u usporedbi s drugim semaforinima koje sam analizirao u ovom istraživanju. Obzirom na to da

je SEMA-3C primarno uključen u procese angiogeneze, onkogeneze, staničnih migracija, kardio-neuralnog razvoja te aksonskog navođenja (Neufeld i sur. 2005), niska ekspresija u virusnom hepatitisu je u određenoj mjeri očekivana.

Iako se ne ubraja u skupinu imunoloških semaforina, SEMA-3C ima značajnu ulogu u upalnim procesima povezanim sa oštećenjima središnjeg živčanog sustava (SŽS). Mecollari i sur. (2014) pokazali su da SEMA-3C i drugi semaforini te skupine, zajedno sa svojim receptorima, sudjeluju u akutnoj i kroničnoj fazi traume SŽS-a ali kao antagonisti imunološkog odgovora. Lokalna ekspresija SEMA-3C u akutnoj fazi inhibirala je pokretljivost monocita i B-limfocita te suprimirala proupalne signale trombocita dok je u kroničnoj fazi inhibirala proliferaciju T-limfocita kao i biosintezu citokina poput IL-4 i IFN $\gamma$ . S druge strane, zabilježen je i utjecaj na apoptozu supresorskih M2 makrofaga čime se indirektno stimulira proupalni okoliš na mjestu ozljede. Kako niti jedan od naših ispitanika nije imao komorbiditet ove vrste, niska razina SEMA-3C u većini uzoraka je očekivana.

Rezultati ovog istraživanja također su pokazali da nema značajne razlike u koncentraciji semaforina kod bolesnika s kroničnom infekcijom HCV-om i HBV-om no dokazana je razlika u usporedbi sa zdravim kontrolama što ukazuje na sličnost u mehanizmima djelovanja i signalnim putevima patogeneze induciranim različitim virusima hepatitisa. Konačno, nije uočena statistički značajna razlika u virološkim i kliničkim parametrima poput fibroze i stupnja viremije između infekcija različitim genotipovima HCV-a što sugerira visoko očuvan, iako ne u potpunosti istražen, mehanizam patogeneze neovisan o samoj molekularnoj heterogenosti virusa.

Unatoč znatnom napretku zadnjih godina u istraživanju funkcije imunoloških semaforina ostao je veliki broj neriješenih pitanja pogotovo u kontekstu infektivnih bolesti. To se prvenstveno odnosi na molekularne mehanizme interakcija kojima semaforini ostvaruju svoj utjecaj te kompleksne mreže signalnih puteva u kojima sudjeluju. Primjena DAA omogućuje eradikaciju HCV-a u više od 95% zaraženih osoba (Afdhal i sur. 2014) no rezultati praćenja bolesnika pokazuju da je reverzija stupnja fibroze jetre nakon izlječenja od virusne infekcije neadekvatna. Stoga su upravo istraživanja patogeneze kroničnog hepatitisa C u kontekstu uloge semaforina ali i drugih modulatora biološkog odgovora iznimno značajna za razvoj dodatnih terapijskih mogućnosti (poput imunoterapije), posebno u bolesnika s visokim stupnjem fibroze nakon eradikacije virusne infekcije.

## 5. Zaključci

Semaforini-4D, -6D, -7A i -3C eksprimirani su u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C i B te u zdravih kontrola.

Koncentracija semaforina-7A u serumu bolesnika s kroničnim hepatitisom C i B značajno je veća u usporedbi sa zdravim kontrolama.

Koncentracija semaforina-4D i semaforina-6D u bolesnika s kroničnim hepatitisom C značajno korelira s kinetikom virusne replikacije.

Utvrđena je korelacija između stupnja fibroze jetre i kinetike virusne replikacije kod bolesnika s virusnim hepatitisom C.

Nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracijama pojedinačnih semaforina te ispitivanim virološkim i kliničkim parametrima infekcije ovisno o genotipu HCV-a.

## 6. Literatura

Afdhal N, Zeuzem S, Kwo P, Chojkier M, Gitlin N, Puoti M (2014) Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 370: 1889–1898

Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (2010) Causes of death in HIV-1-infected patients treated with antiretroviral therapy, 1996-2006: collaborative analysis of 13 HIV cohort studies. *Clin Infect Dis* 50: 1387-1396

Atoom AM, Taylor NGA, Russell RS (2014) The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein. *Virology* 462: 377-387

Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1–E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197: 633–642

Beales LP, Rowlands DJ, Holzenburg A (2001) The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* 7: 661–670

Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B (1999) Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 24: 261-263

Bougeret C, Mansur IG, Dastot H, Schmid M, Mahouy G, Bensussan A, Boumsell L (1992) Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. *J Immunol* 148: 318-323

Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV (2011) Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* 85: 596–605

Catalano A, Lazzarini R, DiNuzzo S, Orciari S, Procopio A (2009) The Plexin-A1 receptor activates vascular endothelial growth factor-receptor 2 and nuclear factor-B to mediate survival and anchorage-independent growth of malignant mesothelioma cells. *Cancer Res* 69: 1485-1493

Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C (2005) Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 128: 1437–1444

Coller KE, Berger KL, Heaton NS, Cooper JD, Yoon R, Randall G (2009) RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog* 5:e1000702

Cooke GS, Lemoine M, Thursz M, Gore C, Swan T, Kamarulzaman A, DuCros P, Ford N (2013) Viral hepatitis and the Global Burden of Disease: a need to regroup. *J Viral Hepat* 20: 600-601

- Czopik AK, Bynoe MS, Palm N, Raine CS, Medzhitov R (2006) Semaphorin 7A is a negative regulator of T cell responses. *Immunity* 24: 591-600
- Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guerin M, Mancip J, Granio O (2012) Characterization of hepatitis C virus particle sub-populations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem* 287: 31242–31257
- Delorme G, Saltel F, Bonnelye E, Jurdic P, Machuca-Gayet I. (2005) Expression and function of semaphorin 7A in bone cells. *Biol Cell* 97: 589–597
- De Minicis S, Rychlicki C, Agostinelli L, Saccomanno S, Trozzi L, Candelaresi C, Bataller R, Millán C, Brenner DA, Vivarelli M, Mocchegiani F, Marzioni M, Benedetti A, Svegliati-Baroni G (2013) Semaphorin 7A contributes to TGF-beta-mediated liver fibrogenesis. *Am J Pathol* 183: 820–830
- Dill MT, Makowska Z, Duong FH, Merkofer F, Filipowicz M, Baumert TF (2012) Interferon-gamma-stimulated genes, but not USP18, are expressed in livers of patients with acute hepatitis C. *Gastroenterology* 143:766–776
- Douam F, Dao Thi VL, Maurin G, Fresquet J, Mompelat D, Zeisel MB (2014) Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology* 59: 776–788
- Dumoulin FL, von dem Bussche A, Li J, Khamzina L, Wands JR, Sauerbruch T, Spengler U (2003) Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* 305: 260–266
- Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S (2003) Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* 33: 388–391
- Edlich B, Ahlenstiel G, Zabaleta Azpiroz A, Stoltzfus J, Nouredin M, Serti E (2012) Early changes in interferon signalling define natural killer cell response and refractoriness to interferon-based therapy of hepatitis C patients. *Hepatology* 55: 39–48
- Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76: 5974–5984
- Erdtmann L, Franck N, Lerat H, Le Seyec J, Gilot D, Cannie I, Gripon P, Hibner U, Guguen-Guillouzo C (2003) The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278: 18256–18264

- Evans MJ, Rice CM, Goff SP (2004) Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13038–13043
- Ferraris P, Blanchard E, Roingeard P (2010) Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol* 91: 2230–2237
- Flint M, McKeating JA (2000) The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol* 10: 101–117
- Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, Videtta M, Morrone S, Labbadia G (2009) PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 119: 551–564
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL (2002) Peg-interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975–982
- Gale MJ, Korth MJ, Katze MG (1998) Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* 10:157–162
- Gan Y, Reilkoff R, Peng X, Russell T, Chen Q, Mathai SK, Herzog E (2011) Role of Semaphorin 7a signaling in TGF- $\beta$ 1 induced lung fibrosis and scleroderma-related interstitial lung disease. *Arthritis Rheumatol* 63: 2484–2494
- Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY (2004) The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* 14: 669–678
- Gitler AD, Lu MM, Epstein JA (2004) Plexin-D1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Dev Cell* 7: 107–116
- Glinka Y, Prud'homme GJ (2008) Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 84: 302-310
- Godzik P, Kołakowska A, Madaliński K, Stepień M, ZielińskiA, Góralewska A, Kazimierska M (2012) Prevalence of anti-HCV antibodies among adults in Poland - results of cross sectional study in general population. *Przegl Epidemiol* 66: 575-580
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
- He Y, Guo Y, Zhou Y, Zhang Y, Fan C, Ji G, Jia Z (2014) CD100 up-regulation induced by Interferon- $\alpha$  on B cells is related to Hepatitis C Virus infection. *PLoS Pathog* 9:e113338.



- Holmes S, Downs AM, Fosberry A, Hayes PD, Michalovich D, Murdoch P, Moores K, Wixted J, Deen K, Pettman G, Wattam T, Lewis C (2002) Sema7A is a potent monocyte stimulator. *Scand J Immunol* 56: 270-275
- Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5: 987–995
- Janssen BJC, Robinson RA, Pérez-Brangulí F, Bell CH, Mitchell KJ, Siebold C, Jones EY (2010) Structural basis of semaphorin–plexin signalling. *Nature* 467: 1118–1122
- Kang HR, Lee CG, Homer RJ, Elias JA (2007) Semaphorin 7A plays a critical role in TGF-beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 204: 1083–1093
- Kim H, Bose SK, Meyer K, Ray R (2014) Hepatitis C virus impairs natural killer cell-mediated augmentation of complement synthesis. *J Virol* 88: 2564–2571
- Klenerman P, Thimme R (2012) T-cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. *Gut* 61: 1226–1234
- Kolodkin AL, Matthes D, O'Connor T, Patel NH, Admon A, Bentley D, Goodman CS (1992) Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9: 831-845
- Kroy DC, Ciuffreda D, Cooperrider JH, Tomlinson M, Hauck GD, Aneja J (2014) Liver environment and HCV replication affect human T-cell phenotype and expression of inhibitory receptors. *Gastroenterology* 146: 550–561
- Lauer GM, Walker BD (2001) Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 345: 41-52
- Li BJ, He Y, Zhang Y, Guo YH, Zhou Y, Zhang PX, Wang W (2017) Interferon- $\alpha$ -induced CD100 on naïve CD8<sup>+</sup> T cells enhances antiviral responses to hepatitis C infection through CD72 signal transduction. *J Int Med Res* 45: 89-100
- Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P (2004) Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10149–10154
- Lohmann V (2013) Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 369:167–198
- Lu T, Tsai M, Hsiao C, Lai L, Chuang E (2012) Expression and functions of semaphorins in cancer. *Transl Cancer Res* 1: 74-87

- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R (2001) Peg-interferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358: 958–965
- Martin DN, Uprichard SL (2013) Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 10777–10782
- Martin NK, Hickman M, Hutchinson SJ, Goldberg DJ, Vickerman P (2013) Combination interventions to prevent HCV transmission among people who inject drugs: modeling the impact of anti-viral treatment, needle and syringe programs, and opiate substitution therapy. *Clin Infect Dis* 57: 39–45
- Masaki T, Suzuki R, Murakami K (2008) Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* 82:7964–7976
- Mecollari V, Nieuwenhuis B, Verhaagen J (2014) A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma. *Front Cell Neurosci* 8: 328–345
- Merz A, Long G, Hiet MS, Bruegger B, Chlanda P, Andre P (2011) Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* 286: 3018–3032
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9: 1089–1097
- Mohd-Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST (2013) Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 57:1333–1342
- Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, Jessen B, Rieger T, Falcone V (2010) Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *J Virol* 84: 5670–5677
- Negishi M, Oinuma I., Katoh H (2005) R-ras as a key player for signaling pathway of plexins. *Mol Neurobiol* 32: 217–222
- Neufeld G, Shrager-Heled N, Lange T, Guttmann-Raviv N, Herzog Y, Kessler O (2005) Semaphorins in cancer. *Front Biosci* 10: 751–760
- O'Connor BP, Eun SY, Ye Z, Zozulya AL, Lich JD, Moore CB, Ting JPY (2008) Semaphorin 6D regulates the late phase of CD4<sup>+</sup> T cell primary immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13015–13020

Oinuma I, Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M (2004) The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* 305: 862-865

Pawlotsky JM, McHutchison JG (2004) Hepatitis C. Development of new drugs and clinical trials: promises and pitfalls. Summary of an AASLD hepatitis single topic conference, Chicago, IL, February 27–March 1, 2003. *Hepatology* 39: 554–567

Pawlotsky JM (2014) New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology* 146: 1176–1192

Pelletier S, Drouin C, Bedard N, Khakoo SI, Bruneau J, Shoukry NH (2010) Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *J Hepatol* 53: 805–816

Qu X, Wei H, Zhai Y, Que H, Chen Q, Tang F, Wu Y, Xing G (2002) Identification, characterization, and functional study of the two novel human members of the semaphorin gene family. *J Biol Chem* 277: 35574–35585

Razavi H, Elkhoury AC, Elbasha E, Estes C, Pasini K, Poynard T, Kumar R (2013) Chronic hepatitis C virus (HCV) disease burden and cost in the United States. *Hepatology* 57: 2164-2170

Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P (2011).Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 9: 32–45

Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U (2012) Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 8:e1003056

Rosen HR (2013) Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 123: 4121–4130

Santantonio T, Wiegand J, Gerlach JT (2008) Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. *J Hepatol* 49: 625–633

Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, Filipowicz W (2008) Interferon signalling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7034–7039

Schlaphoff V, Lunemann S, Suneetha PV, Jaroszewicz J, Grabowski J, Dietz J (2011) Dual function of the NK cell receptor 2B4 (CD244) in the regulation of HCV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *PLoS Pathog* 7:e1002045

- Scott GA, McClelland LA, Fricke AF (2008) Semaphorin 7a promotes spreading and dendricity in human melanocytes through beta1-integrins. *J Invest Dermatol* 128: 151-161
- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5: 558–567
- Soriano V, Peters MG, Zeuzem S (2009) New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 48: 313–320
- Stetson DB, Medzhitov R (2006) Type I interferons in host defence. *Immunity* 25: 373–381
- Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R (2002) Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15669–15674
- Suzuki K, Okuno T, Yamamoto M, Pasterkamp RJ, Takegahara N, Takamatsu H (2007) Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature* 446: 680–684
- Takahashi K, Asabe S, Wieland S, Garaigorta U, Gastaminza P, Isogawa M (2010) Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 7431–7436
- Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A (2000) Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 6: 578–582
- Tellinghuisen TL, Evans MJ, Von Hahn T, You S, Rice CM (2007) Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* 81: 8853-8867
- Tian Z, Chen Y, Gao B. Natural killer cells in liver disease. *Hepatology* 57: 1654–1662
- Toyofuku T, Yabuki M, Kamei J, Kamei M, Makino N, Kumanogoh A, Hori M (2007) Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1. *Embo J* 26: 1373-1384
- Toyofuku T, Kamei M, Makino N (2008) Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. *Dev Biol* 321: 251-262
- Vieyres G, Thomas X, Descamps V, Duverlie G, Patel AH, Dubuisson J (2010) Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol* 84: 10159–10168
- Vieyres G, Dubuisson J, Pietschmann T (2014) Incorporation of hepatitis C virus e1 and e2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. *Viruses* 6: 1149–1187

- Watarai H, Sekine E, Inoue S, Nakagawa R, Kaisho T, Taniguchi M (2008) PDC-TREM, a plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, is responsible for augmented production of type I interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2993–2998
- Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K (2005) Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 19:111–122.
- Wedemeyer H, Duberg AS, Buti M, Rosenberg WM, Frankova S, Esmat G, Örmeci N, Sievert W, Gower E (2014) Strategies to manage hepatitis C virus (HCV) disease burden. *J Viral Hepat* 21: 60-89
- Wieland S, Makowska Z, Campana B, Calabrese D, Dill MT, Chung J (2014) Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. *Hepatology* 59: 2121–2130
- Worzfeld T, Puschel AW, Offermanns S, Kuner R (2004) Plexin-B family members demonstrate non-redundant expression patterns in the developing mouse nervous system: an anatomical basis for morphogenetic effects of Sema4D during development. *Eur J Neurosci* 19: 2622–2632
- Wozniak AL, Griffin S, Rowlands D, Harris M, Yi M, Lemon SM, Weinman SA (2010) Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog* 6:e1001087
- Yeping Z, Rou-Afza FG, Pasterkamp RJ (2008) Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* 33: 161-170
- Yi M, Lemon SM (2003) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77: 3557–3568
- Yoneyama M, Fujita T (2007) Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* 282: 15315–15318
- Zhang C, Cai Z, Kim YC, Kumar R, Yuan F, Shi PY, Kao C, Luo G (2005) Stimulation of hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity by the NS3 protease domain and by HCV RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 79: 8687–8697
- Zhang S, Saha B, Kodys K, Szabo G (2013) IFN-gamma production by human natural killer cells in response to HCV-infected hepatoma cells is dependent on accessory cells. *J Hepatol* 59: 442–449

# 7. Životopis

## Obrazovanje

**2013.-2017.** Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski studij molekularne biologije

**2009.-2013.** Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Preddiplomski studij molekularne biologije

**2001.-2005.** IX. Gimnazija u Zagrebu

## Iskustvo u struci

Laboratorijska praksa:

Zoologijski zavod Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Damjana Franjevića

## Volonterski rad

Noć biologije, PMF, Zagreb

## Osobne i komunikacijske vještine

Materinski jezik: hrvatski    Strani jezici: engleski (C1), talijanski (B1)

Digitalna kompetencija (Windows; MacOS; Microsoft Office paket; SPSS Statistics)

Vozačka dozvola B kategorije